

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393011** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.03.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.27

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ IN VIVO ОПОСРЕДОВАННОГО НУКЛЕАЗОЙ
НАЦЕЛИВАНИЯ НА ГЕНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ**

(31) 63/180,603; 63/242,474; 63/244,205;
63/301,933; 63/331,385

(32) 2021.04.27; 2021.09.09; 2021.09.14;
2022.01.21; 2022.04.15

(33) US

(86) PCT/US2022/026483

(87) WO 2022/232232 2022.11.03

(71) Заявитель:
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Изобретатель:
Ван Лили, Уилсон Джеймс М.,
Третьякова Анна (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложена двойная векторная система для лечения генетического нарушения. Эта система содержит: (a) вектор для редактирования генов, содержащий экспрессионную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9; и (b) донорный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный продукт для экспрессии из локуса PCSK9, при этом вставленная последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует PCSK9, при этом система дополнительно содержит последовательности, которые направляют нуклеазу для специфического нацеливания на локус нативного гена PCSK9; и при этом после введения двойной векторной системы происходит необязательная абляция или уменьшение количества нативного PCSK9 в клетке-мишени.

A1

202393011

202393011

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579542EA/023

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ IN VIVO ОПОСРЕДОВАННОГО НУКЛЕАЗОЙ НАЦЕЛИВАНИЯ НА ГЕНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Сайт-специфические нуклеазы (такие как CRISPR-Cas9 или мегануклеазы) создают двухцепочечные разрывы (ДЦР) в хромосоме, что приводит к репарации ДНК. В присутствии донорной ДНК происходит гомологичная репарация (HDR) с замещением генетической информации в хромосоме новой информацией из донорного гена.

Процесс гомологичной репарации (HDR) представляет собой процесс, в котором происходит репарация двухцепочечного разрыва (ДЦР) в ДНК за счет гомологичной рекомбинации с использованием ДНК-матрицы. Эта матрица может поступать из клетки во время поздней S-фазы или G2-фазы клеточного цикла, когда доступны сестринские хроматиды перед завершением митоза. Кроме того, в клетку можно доставлять экзогенные матрицы репарации, чаще всего в форме синтетического одноцепочечного донорного ДНК-олигонуклеотида или донорной плазмиды, для внесения точного изменения в геном.

Безопасные приемные сайты (SHS) представляют собой геномные локусы, в которые можно безопасно вставлять и экспрессировать гены или другие генетические элементы. Эти SHS являются критически важными для эффективной генной терапии заболеваний человека; для исследования структуры, функции и регуляции генов; и для маркировки и отслеживания клеток.

Необходимы улучшенные композиции и способы для редактирования генов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе предложены композиции, способы, системы и наборы для редактирования генов, которые позволяют осуществлять нокдаун или абляцию нативного гена PCSK9 и вставку и/или экспрессию экзогенного трансгена в локус гена PCSK9.

В первом аспекте в данном документе предложена система для лечения генетического нарушения. Эта система содержит компонент редактирования генов, содержащий экспрессионную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, нацеленную на ген PCSK9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9. Эта система дополнительно содержит донорный вектор, содержащий трансгенную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансген, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, при этом донорный вектор дополнительно содержит плечи обусловленной гомологией рекомбинации (HDR) 5' и 3' относительно трансгенной кассеты, при этом трансген не представляет собой PCSK9. Нуклеаза нацелена на ген PCSK9. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза нацелена на экзон 7 PCSK9. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза представляет собой

мегануклеазу ARCUS.

В некоторых вариантах осуществления компонент редактирования генов содержит последовательность, которая кодирует Cas9. В определенных вариантах осуществления вектор для редактирования генов дополнительно содержит последовательность, которая кодирует оgРНК, содержащую затравочную область из по меньшей мере 20 нуклеотидов, при этом оgРНК специфически связывается с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9.

В других вариантах осуществления донорный вектор дополнительно содержит последовательности, которые кодируют оgРНК, содержащую затравочную область из по меньшей мере 20 нуклеотидов, при этом оgРНК специфически связывается с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9.

В другом аспекте в данном документе предложена система для лечения генетического нарушения. Эта система содержит компонент редактирования генов, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, нацеленную на ген PCSK9. Эта система дополнительно содержит донорный вектор, содержащий трансгенную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансген, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, при этом донорный вектор дополнительно содержит плечи обусловленной гомологией рекомбинации (HDR) 5' и 3' относительно трансгенной кассеты, при этом трансген не представляет собой PCSK9. Нуклеаза нацелена на ген PCSK9. В определенных вариантах осуществления компонент редактирования генов находится в липидной наночастице.

В некоторых вариантах осуществления компонент редактирования генов содержит последовательность, которая кодирует Cas9. В определенных вариантах осуществления вектор для редактирования генов дополнительно содержит последовательность, которая кодирует оgРНК, содержащую затравочную область из по меньшей мере 20 нуклеотидов, при этом оgРНК специфически связывается с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9.

В других вариантах осуществления донорный вектор дополнительно содержит последовательность, которая кодирует оgРНК, содержащую затравочную область из по меньшей мере 20 нуклеотидов, при этом оgРНК специфически связывается с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9.

В определенных вариантах осуществления трансген относится к метаболическому нарушению со стороны печени. В определенных вариантах осуществления трансген представляет собой OTC, PKU, CTLN1 или LDLR.

В определенных вариантах осуществления векторы представляют собой

аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы, и при этом векторы содержат 5' ИКП AAV и 3' ИКП AAV.

В другом варианте осуществления двойная векторная система для лечения генетического нарушения содержит AAV для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный геном, содержащий 5' ИКП, последовательность, кодирующую мегануклеазу, нацеленную на PCSK9, под управлением регуляторных последовательностей, которые управляют экспрессией мегануклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, и 3' ИКП; и донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, 3' плечо HDR и 3' ИКП, при этом трансген не кодирует PCSK9.

В другом варианте осуществления двойная векторная система для лечения генетического нарушения содержит AAV для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный геном, содержащий 5' ИКП, 5' сигнал ядерной локализации (СЯЛ), последовательность, кодирующую Cas9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией saCas9 в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, 3' СЯЛ и 3' ИКП; и донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, 3' плечо HDR, промотор U6, оgРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9, и 3' ИКП, при этом трансген не кодирует PCSK9.

В еще другом варианте осуществления двойная векторная система для лечения генетического нарушения содержит AAV-вектор для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный геном, содержащий 5' ИКП, промотор U6, оgРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9, 5' сигнал ядерной локализации (СЯЛ), последовательность, кодирующую Cas9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией Cas9 в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, 3' СЯЛ и 3' ИКП; и донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, 3' плечо HDR и 3' ИКП.

В некоторых вариантах осуществления AAV-вектор для редактирования генов и донорный AAV-вектор имеют одинаковый капсид AAV. В других вариантах

осуществления AAV-вектор для редактирования генов и донорный AAV-вектор имеют разные капсиды AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV выбран из AAV8, AAV9, rh10, AAV6.2, AAV3B, hu37, rh79 и rh64.

В другом аспекте предложен способ лечения нарушения у людей путем совместного введения двойной векторной системы, описанной в данном документе.

В другом аспекте предложен способ лечения метаболического нарушения со стороны печени, который включает совместное введение субъекту, имеющему метаболическое нарушение со стороны печени, AAV-вектора для редактирования генов, содержащего последовательность, кодирующую нуклеазу, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9; и донорный AAV-вектор, содержащий трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, при этом донорный вектор дополнительно содержит плечи обусловленной гомологией рекомбинации (HDR) 5' и 3' относительно трансгенной кассеты, при этом трансген не представляет собой PCSK9. В определенных вариантах осуществления метаболическое нарушение со стороны печени представляет собой дефицит орнитинтранскарбамилазы. В других вариантах осуществления - семейную гиперхолестеринемию или фенилкетонурию. В одном варианте осуществления субъект представляет собой новорожденного.

В другом аспекте предложена система для лечения генетических нарушений. Эта система содержит липидную наночастицу (ЛНЧ), содержащую последовательность мРНК, кодирующую нуклеазу, нацеленную на ген PCSK9; и донорный AAV-вектор, содержащий трансген и регуляторные последовательности, которые управляют его экспрессией в клетке-мишени, при этом донорный вектор дополнительно содержит плечи обусловленной гомологией рекомбинации (HDR) 5' и 3' относительно трансгена, при этом трансген не представляет собой PCSK9. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза нацелена на экзон 7 PCSK9. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза представляет собой мегануклеазу ARCUS.

В других вариантах осуществления вектор для редактирования генов кодирует Cas9. В определенных вариантах осуществления вектор для редактирования генов дополнительно кодирует огРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которая специфически связывается с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9. В некоторых вариантах осуществления, в которых система содержит ЛНЧ, эта ЛНЧ содержит как кодирующую Cas9 последовательность, так и огРНК.

В других вариантах осуществления донорный вектор дополнительно кодирует огРНК, содержащую затравочную область из по меньшей мере 20 нуклеотидов, при этом огРНК специфически связывается с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9.

В еще другом аспекте предложена двойная векторная система для лечения генетического нарушения. Эта система содержит вектор для редактирования генов, содержащий экспрессионную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9; и донорный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный продукт для экспрессии из локуса PCSK9, при этом вставленная последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует PCSK9, при этом система дополнительно содержит последовательности, которые направляют нуклеазу для специфического нацеливания на локус нативного гена PCSK9; и при этом после введения двойной векторной системы происходит необязательная абляция или уменьшение количества нативного PCSK9 в клетке-мишени.

В еще другом аспекте предложен способ лечения пациента с использованием системы, описанной в данном документе, при этом уровни экспрессии нативного PCSK9 у пациента снижаются, и при этом пациент экспрессирует экзогенный продукт.

В еще другом аспекте предложена сконструированная кодирующая последовательность для орнитинтранскарбамилазы. Также включены векторы, экспрессионные кассеты и рекомбинантные вирусы, содержащие их.

Другие аспекты и преимущества изобретения станут очевидны из нижеприведенного подробного описания изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 проиллюстрировано схематическое представление локуса rhPCSK9, иллюстрирующее донорный сайт сплайсинга в экзоне 7, донорный вектор HDR, содержащий представляющую интерес донорную матрицу, например, hFIX, hOTC.

На Фиг. 2 проиллюстрирован график пилотного исследования, включающего нокин минигена hFIX в локусе PCSK9 посредством ARCUS2 или SaCas9 у новорожденных ОЧП.

На Фиг. 3А-3С проиллюстрировано схематическое представление двойной AAV-векторной системы для SaCas9- или ARCUS-опосредованной коррекции генов. На Фиг. 3А проиллюстрировано схематическое представление двойной AAVhu37-векторной системы для ARCUS2-опосредованной коррекции генов, при этом донорный AAVhu37-вектор содержит последовательность донорной матрицы hOTC. На Фиг. 3В проиллюстрировано схематическое представление двойной AAVhu37-векторной системы для SaCas9-опосредованной коррекции генов (транс; AAVhu37-SaCas9), при этом экспрессионные кассеты для SaCas9 и ogPHK находятся в двух отдельных векторах, а донорный AAVhu37.ogPHK-вектор содержит последовательность донорной матрицы hOTC и кассету U6.ogPHK. На Фиг. 3С проиллюстрировано схематическое представление двойной AAVhu37-векторной системы для SaCas9-опосредованной коррекции генов (цис; AAVhu37.PCSK9-sgRNA.SaCas9), при этом экспрессионные кассеты для SaCas9 и ogPHK находятся в одном векторе, а донорный вектор hOTC находится в отдельном векторе.

На Фиг. 4А-4Н проиллюстрировано *in vivo* исследование опосредованного нуклеазой нацеливания на гены у новорожденных ОЧП. Животным вводили 1×10^{13} ГК/кг AAVhu37.ARCUS2.WPRE и 3×10^{13} ГК/кг AAVhu37.hFIXco-HDR или 1×10^{13} ГК/кг AAVhu37.SaCas9.WPRE и 3×10^{13} ГК/кг AAVhu37.hFIXco-HDR.U6.sgR или 1×10^{13} ГК/кг AAVhu37.GFP.WPRE и 3×10^{13} ГК/кг AAVhu37.hFIXco-HDR.U6.sgR, как проиллюстрировано на Фиг. 4А, 4В и 5G. На Фиг. 4С проиллюстрированы уровни hFIX в указанные моменты времени (приведенные в нг/мл) у новорожденных ОЧП. На Фиг. 4D проиллюстрированы уровни PCSK9 в указанные моменты времени (приведенные в процентах от исходного уровня в день 0) у новорожденных ОЧП. На Фиг. 4Е проиллюстрированы уровни АЛТ (аланинаминотрансферазы) в указанные моменты времени (приведенные в Е/л) у новорожденных ОЧП. На Фиг. 4F проиллюстрированы уровни IgG к FIX в указанные моменты времени (приведенные в единицах коэффициента разведения, 1/разведение) у новорожденных ОЧП. На Фиг. 4G проиллюстрированы уровни PCSK9 в указанные моменты времени (приведенные в нг/мл) у новорожденных ОЧП. На Фиг. 4Н проиллюстрирована измеренная масса (приведенная в г) новорожденных ОЧП.

На Фиг. 5А-5Н проиллюстрированы результаты *in vivo* исследования, описанного для Фиг. 4, при введении 3-месячным детенышам ОЧП. На Фиг. 5А проиллюстрированы уровни hFIX в указанные моменты времени (приведенные в нг/мл) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5В проиллюстрированы уровни PCSK9 в указанные моменты времени (приведенные в процентах от исходного уровня в день 0) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5С проиллюстрированы уровни АЛТ (аланинаминотрансферазы) в указанные моменты времени (приведенные в Е/л) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5D проиллюстрированы уровни IgG к FIX в указанные моменты времени (приведенные в единицах коэффициента разведения, 1/разведение) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5Е проиллюстрированы уровни PCSK9 в указанные моменты времени (приведенные в нг/мл) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5F проиллюстрирована измеренная масса в указанные моменты времени (приведенная в г) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5G приведена сводная таблица с данными по эксперименту, описанному на Фиг. 4А-5G. На Фиг. 5Н проиллюстрировано сравнение различных данных между исследованными новорожденными ОЧП и детенышами ОЧП.

На Фиг. 6А-6G проиллюстрированы трансдукция вектора (ГК) и экспрессия трансгена в образцах биопсии печени, полученных в различные дни после обработки у НЧП, обработанных так, как описано для Фин. 4А-4Н. На Фиг. 6А проиллюстрированы уровни трансдукции вектора в образцах биопсии печени, приведенные в единицах геномных копий AAV (ГК) на диплоидную клетку. На Фиг. 6В проиллюстрирована относительная экспрессия РНК трансгена в образцах биопсии печени. На Фиг. 6С проиллюстрирована двойная гибридизация *in situ* (ISH, англ. «*in situ hybridization*») с использованием специфических зондов для выявления FIX и ARCUS в образцах биопсии печени. На Фиг. 6D приведены цифровые изображения ISH, используемые для количественного определения процента трансдукции. На Фиг. 6Е проиллюстрирована

эффективность трансдукции трансгена FIX по данным количественного определения методом ISH, которая приведена в процентах трансдукции.

На Фиг. 7А-7L приведены данные двойной гибридизации *in situ* (ISH) с использованием специфических зондов для выявления FIX и ARCUS в образцах биопсии печени, полученных через 84 дня после обработки от ОЧП; изображения приведены при различном увеличении (ОЧП, обработанные AAVhu37.ARCUS2 и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX). На Фиг. 7А проиллюстрирован выявленный с помощью ISH ARCUS в образцах биопсии печени при 4х увеличении. На Фиг. 7В проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 4х увеличении. На Фиг. 7С приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ARCUS и hFIX при 4х увеличении. На Фиг. 7D проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ARCUS и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 4х увеличении. На Фиг. 7Е проиллюстрирован выявленный с помощью ISH ARCUS в образцах биопсии печени при 10х увеличении. На Фиг. 7F проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 10х увеличении. На Фиг. 7G приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ARCUS и hFIX при 10х увеличении. На Фиг. 7H проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ARCUS и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 10х увеличении. На Фиг. 7I проиллюстрирован выявленная с помощью ISH экспрессия ARCUS в образцах биопсии печени при 20х увеличении. На Фиг. 7J проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 20х увеличении. На Фиг. 7K приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ARCUS и hFIX при 20х увеличении. На Фиг. 7L проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ARCUS и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 20х увеличении.

На Фиг. 8А-8М приведены данные двойной гибридизации *in situ* (ISH) с использованием специфических зондов для выявления FIX и ARCUS в образцах биопсии печени, полученных через 84 дня после обработки от ОЧП; изображения приведены при различном увеличении (ОЧП, обработанные AAVhu37.EGFP и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX.U6.sgR). На Фиг. 8А проиллюстрирован выявленный с помощью ISH ЗФБ-WRPE в образцах биопсии печени при 4х увеличении. На Фиг. 8В проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 4х увеличении. На Фиг. 8С приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX при 4х увеличении. На Фиг. 8D проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 4х увеличении. На Фиг. 8Е проиллюстрирован выявленный с помощью ISH ЗФБ-WRPE в образцах биопсии печени при 10х увеличении. На Фиг. 8F проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 10х увеличении. На Фиг. 8G приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX при 10х увеличении. На Фиг. 8H проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 10х

увеличении. На Фиг. 8I проиллюстрирован выявленная с помощью ISH экспрессия ЗФБ-WRPE в образцах биопсии печени при 20x увеличении. На Фиг. 8J проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 20x увеличении. На Фиг. 8K приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX при 20x увеличении. На Фиг. 8L проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 20x увеличении. На Фиг. 8M проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 20x увеличении в необработанном контроле.

На Фиг. 9 проиллюстрировано ARCUS-опосредованное целевое редактирование у ОЧП, обработанных AAVhu37.ARCUS2 и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX. Через 84 дня после обработки получали образцы биопсии печени, а процент общего количества инделов в целевой области рассчитывали на основании данных секвенирования ампликона.

На Фиг. 10A-10B проиллюстрировано схематическое представление мышинной модели PCSK9-hE7-KI. На Фиг. 10A проиллюстрировано схематическое представление экзона 7 мышинового *pcsk9*, замещенного экзоном 7 человеческого *pcsk9* (hE7 содержит последовательность, нацеленную на ARCUS). Последовательность экзона 7 человеческого PCSK9 приведена в SEQ ID NO: 44. На Фиг. 10B проиллюстрировано схематическое представление скрещивания мышинной модели PCSK9-hE7-KI с другими мышинными моделями заболевания, такими как ОТС *spf^{ash}*, модель KI-*spf^{ash}*. Мышиную модель с нокаутом *PCSK9-hE7-KI* сначала создавали путем замещения области, содержащей экзон 7 мышинового гена *Pcsk9*, областью человеческого гена *PCSK9*, содержащей экзон 7. Затем мышей *PCSK9-hE7-KI* скрещивали с мышами с редким серым мехом (англ. «sparse fur ash») (*spf^{ash}*), которые демонстрируют 20-кратное снижение экспрессии ОТС вследствие точечной мутации с G на A в донорном сайте сплайсинга в конце экзона 4 гена *Otc*. Мышей, полученных от этого скрещивания, назвали мышами *PCSK9-hE7-KI.spf^{ash}* и использовали, как описано в данном документе. *Сокращения*: п. о., пара оснований; E6, экзон 6; E7: экзон 7; E8, экзон 8; HDR, обусловленная гомологией рекомбинация; *PCSK9*, пропротеинконвертаза субтилизин-кексинового типа 9 (ген, человеческий); *Pcsk9*, пропротеинконвертаза субтилизин-кексинового типа 9 (ген, мышинный).

На Фиг. 11A-11I проиллюстрировано *in vivo* исследование опосредованного нуклеазой нацеливания на гены у новорожденных ОЧП для векторов, проиллюстрированное на Фиг. 11I. На Фиг. 11A приведена таблица, иллюстрирующая экспериментальный дизайн *in vivo* исследования опосредованного нуклеазой нацеливания на гены у новорожденных ОЧП для векторов, описанного в примере 3. Животные 21-111, 21-122 и 21-113 были положительными в отношении AAV-связывающего антитела (VAb) перед введением дозы. В день 0 получали образцы от 21-178 после введения вектора, который помешал бы анализу Vab. ^с: приведено число сайтов ОТ, идентифицированных в независимом анализе методом секвенирования ИКП. На Фиг. 11B проиллюстрированы уровни PCSK9, приведенные в нг/мл, или % от дня 0 (нижний ряд) для групп, как

проиллюстрировано на Фиг. 11А. На Фиг. 11С проиллюстрированы уровни АЛТ, приведенные в Е/л (верхний ряд), или АСТ, приведенные в Е/л (нижний ряд) для групп, как проиллюстрировано на Фиг. 11А. На Фиг. 11D проиллюстрирована эффективность трансдукции трансгена ОТС или IF по данным количественного определения методом ISH, которая приведена в процентах трансдуцированных гепатоцитов. На Фиг. 11E проиллюстрирована масса тела мышей. На Фиг. 11F проиллюстрированы ГК вектора в печени по данным количественного ПЦР-анализа в день 84. На Фиг. 11G проиллюстрирована экспрессия hОТС и нуклеазы в печени макака в день 84, измеренная методом количественной ПЦР в общей РНК, выделенной из образцов биопсии печени, с последующей обратной транскрипцией и представленная в виде уровней относительной экспрессии, нормализованных относительно уровней GAPDH. На Фиг. 11H проиллюстрирован анализ инделов в целевом локусе *rhPCSK9*, проведенный методом секвенирования ампликона, Фиг. 11I приведен схематический график *in vivo* исследования опосредованного нуклеазой нацеливания на гены у новорожденных ОЧП, включающего векторы, исследованные для эксперимента, описанного в примере 3.

На Фиг. 12 проиллюстрировано выравнивание последовательностей для 265 п. о. последовательности, которая представляет последовательность PCSK9 человека из аллели с нокином *pcsk9-hE7*, PCSK9 (*mPCSK9*) мыши и PCSK9 (*rhPCSK9*) макака-резус. *Сокращения*: GAPDH, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ГК, геномные копии; hОТС, орнитинтранскарбамилаза человека; ОТ, нецелевой; ПЦР, полимеразная цепная реакция; *rhPCSK9*, пропротеинконвертаза субтилизин-кексинового типа 9 (ген резуса); РНК, рибонуклеиновая кислота.

На Фиг. 13 проиллюстрировано схематическое представление донорных конструкций для двойной AAV-векторной системы для ARCUS2-опосредованной коррекции генов, при этом донорный AAV-вектор содержит последовательность донорной матрицы hОТС. Проиллюстрирована гомология плеч HDR в конструкциях с нокином в целевых областях мышинной модели (Фиг. 10А-10В), ОЧП и человека.

На Фиг. 14А проиллюстрирован график исследования, включающего нокин минигена hОТС в локусе PCSK9 ARCUS2, проводимого на детенышах PCSK9-hE7-KI.spf-ash (модель частичного дефицита ОТС), описанного в примере 5. На Фиг. 14В проиллюстрированы векторы и дозировки, которые будет получать каждая группа в исследовании с Фиг. 14А.

На Фиг. 14С-14I проиллюстрированы результаты исследования мышей, обработанных векторами, как проиллюстрировано на Фиг. 7, или необработанных (КИ ДТ) и находящихся на диете с высоким содержанием белка (ВБ) в течение 10 дней. На Фиг. 14С проиллюстрирована вероятность выживаемости. На Фиг. 14D проиллюстрирована масса в виде процента от массы до начала ВБ диеты. На Фиг. 14E проиллюстрированы плазменные уровни NH₃ в день 10 ВБ диеты. На Фиг. 14F проиллюстрированы уровни белка *mPCSK9* в день 48. На Фиг. 14G проиллюстрирован % инделов по данным секвенирования ампликона в день 59. На Фиг. 14H проиллюстрированы уровни

транскрипции вектора в образцах биопсии печени, приведенные в единицах геномных копий AAV (ГК) на диплоидную клетку, измеренные в день 59. На Фиг. 14I проиллюстрирован IF ОТС через 8 недель.

На Фиг. 15 приведена схема экспериментального дизайна, описанного в примере 10, для создания нокина минигена hLDLR в локусе PCSK9 с помощью SaCas9 у детенышей PCSK9-hE7-KI.ldr-/ldr-.apobec-/apobec- (модель hoFH).

На Фиг. 16 приведена схема, иллюстрирующая векторы, используемые в примере 10.

На Фиг. 17 проиллюстрирован экспериментальный дизайн примера 10.

На Фиг. 18A-18D проиллюстрированы результаты эксперимента из примера 10. На Фиг. 18A проиллюстрированы сывороточные уровни LDL для обработанных shHDR+saCas9, mhHDR+saCas9, только shHDR и необработанных мышей. На Фиг. 18B проиллюстрирован процент инделов для мышей, обработанных shHDR+saCas9, mhHDR+saCas9, только shHDR. На Фиг. 18C проиллюстрировано число геномных копий hLDLR на диплоидный геном, измеренное в печени в день 63. На Фиг. 18D проиллюстрированы сывороточные уровни LDL в день 63 для обработанных shHDR+saCas9, mhHDR+saCas9, только shHDR и необработанных мышей.

На Фиг. 19 проиллюстрированы иммуногистохимические данные для образцов печени, полученных в день 63, для мышей из примера 10.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе предложены композиции, наборы и способы, которые обеспечивают стабильные долгосрочные терапевтические эффекты для пациентов с некоторыми генетическими нарушениями, включая метаболические нарушения со стороны печени. В композициях, наборах и способах используется нуклеаза, нацеленная на локус PCSK9 клетки-мишени, а донорный вектор обеспечивает матрицу, которая содержит экзогенный продукт для интеграции в локус PCSK9 и экспрессии из него, при этом вставленная последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует PCSK9 и происходит нарушение экспрессии эндогенного PCSK9 со снижением уровней экспрессии.

PCSK9

Пропотеиновая конвертаза субтилизин/кексин 9 (PCSK9) представляет собой сериновую протеазу, которая снижает уровни как печеночного, так и внепеченочного рецептора липопротеинов низкой плотности (LDL) (LDLR; 606945) и повышает плазменный LDL холестерин. PCSK9 является критически важной для регуляции гомеостаза плазменного холестерина. PCSK9 связывается с членами семейства рецепторов липидов низкой плотности, такими как рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR), рецептор липопротеинов очень низкой плотности (VLDLR), рецептор аполипопротеина E (LRP1/APOER), рецептор аполипопротеина 2 (LRP8/APOER2), и способствует их распаду во внутриклеточных кислотных компартментах. PCSK9 человека имеет белковую последовательность NP_777596.2, приведенную в SEQ ID NO: 23, с

кодирующей последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 22.

Хотя ген PCSK9 служил мишенью для лечения связанных с холестерином заболеваний, в данном документе продемонстрировано, что локус гена PCSK9 является безопасным приемным сайтом для нацеливания на гены для вставки других, отличных от PCSK9 трансгенов. Таким образом, в предложенных в данном документе композициях, наборах и способах используются нуклеазы, нацеленные на локус гена PCSK9, и вставка терапевтического трансгена в целевой локус PCSK9 с использованием донорной матрицы.

Предложенные в данном документе композиции, наборы и способы включают компонент редактирования генов (в некоторых вариантах осуществления - вектор) и донорный вектор, который обеспечивает терапевтический трансген для экспрессии в клетке-хозяине.

КОМПОНЕНТ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ

Предложенные в данном документе композиции, наборы и способы включают компонент редактирования генов, который содержит нуклеазу (или кодирующую ее последовательность) и последовательности, которые направляют нуклеазу для специфического нацеливания на локус нативного гена PCSK9 в хромосоме 1. В контексте данного документа «целевой локус PCSK9» или «локус гена PCSK9» представляет собой любой сайт в кодирующей области PCSK9, в который необходимо вставить гетерологичный трансген. В определенных вариантах осуществления целевой локус PCSK9 находится в экзоне 7 кодирующей последовательности PCSK9. На Фиг. 12 приведено выравнивание сайтов сплайсинга экзона 7 PCSK9 человека (h), резуса (rh) и мыши (m), который проиллюстрированы в данном документе, с использованием SaCas9 и мегануклеазы, нацеленной на PCSK9 (называемой ARCUS).

В данном документе описаны композиции, в частности нуклеазы, которые применимы для нацеливания на ген для вставки трансгена, например, нуклеазы, которые являются специфическими в отношении PCSK9. В определенных вариантах осуществления нуклеаза встречается в природе. В других вариантах осуществления нуклеаза не встречается в природе, т. е. является сконструированной в ДНК-связывающем домене и/или домене расщепления. Например, ДНК-связывающий домен встречающейся в природе нуклеазы можно изменять так, чтобы он связывался с выбранным целевым сайтом (например, мегануклеаза, которая была сконструирована для связывания с сайтом, отличным от когнатного сайта связывания). В других вариантах осуществления нуклеаза содержит гетерологичные ДНК-связывающие домены и домены расщепления (например, цинк-пальцевые нуклеазы; TAL-эффекторные нуклеазы; ДНК-связывающие домены мегануклеазы с гетерологичными доменами расщепления).

В определенных вариантах осуществления нуклеаза представляет собой мегануклеазу, нацеленную на PCSK9. Мегануклеазы представляют собой эндодезоксирибонуклеазы, характеризующиеся большим сайтом распознавания (двухцепочечные последовательности ДНК от 12 до 40 пар оснований), например, I-SceI. В комбинации с нуклеазой ДНК можно разрезать в конкретном положении.

Рестрикционные ферменты можно вносить в клетки для применения в редактировании генов или для редактирования генома *in situ*. В определенных вариантах осуществления нуклеаза является членом семейства LAGLIDADG (SEQ ID NO: 31) хоминг-эндонуклеаз. В определенных вариантах осуществления нуклеаза является членом семейства I-CreI хоминг-эндонуклеаз, которое распознает и разрезает последовательность распознавания из 22 пар оснований SEQ ID NO: 32 - CAAAACGTCGTGAGACAGTTTG. Смотрите, например, WO 2009/059195. Были описаны способы рационального конструирования моно-LAGLIDADG (SEQ ID NO: 32) хоминг-эндонуклеаз, которые обеспечивают полное переконструирование I-CreI и других хоминг-эндонуклеаз для нацеливания на очень разнообразные сайты ДНК, включая сайты в геномах млекопитающих, дрожжей, растений, бактерий и вирусов (WO 2007/047859). В одном варианте осуществления нуклеаза кодируется последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 19, нт 330-1424, или последовательностью, имеющей по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичности с ней. В одном варианте осуществления белковая последовательность нуклеазы представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, или последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичности с ней. Такую нуклеазу иногда называют нуклеазой ARCUS. Термин «хоминг-эндонуклеаза» является синонимом с термином «мегануклеаза». Смотрите WO 2018/195449, где описаны определенные мегануклеазы PCSK9, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) представляют собой искусственные рестрикционные ферменты, создаваемые путем слияния цинк-пальцевого ДНК-связывающего домена с ДНК-расщепляющим доменом. Цинк-пальцевые домены можно конструировать для нацеливания на конкретные необходимые последовательности ДНК, что обеспечивает возможность нацеливания цинк-пальцевых нуклеаз на уникальные последовательности в комплексных геномах. Используя преимущество эндогенной машинерии репарации ДНК, эти реагенты можно применять для точного изменения геномов высших организмов и обеспечения выдающегося инструмента в области геномного редактирования. Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), представляют собой рестрикционные ферменты, которые можно конструировать для разрезания конкретных последовательностей ДНК. Их создают путем слияния эффекторного ДНК-связывающего домена TAL с ДНК-расщепляющим доменом (нуклеазой, которая разрезает цепи ДНК). В другом варианте осуществления кодирующая последовательность кодирует цинк-пальцевую нуклеазу или эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TAL) (TALEN).

В определенных вариантах осуществления нуклеаза представляет собой CRISPR-ассоциированную нуклеазу (Cas), необязательно, Cas9. «Cas9» (CRISPR-ассоциированный белок 9) относится к семейству РНК-направляемых ДНК-эндонуклеаз, который характеризуется двумя сигнатурными нуклеазными доменами, RuvC (расщепляет некодирующую цепь) и HNH (кодирующую цепь). Подходящие бактериальные источники

Cas9 включают *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) и *Neisseria meningitidis* [KM Estelt *et al*, Nat Meth, 10: 1116-1121 (2013)]. В описанных в данном документе конструкциях можно использовать кодирующие последовательности дикого типа. В альтернативном варианте бактериальные кодоны оптимизируют для экспрессии у человека, например, используя ряд известных алгоритмов для оптимизации кодонов для человека. В альтернативном варианте эти последовательности можно получать синтетически, полностью или частично. Необязательно, можно замещать другие эндонуклеазы со сходными свойствами. Смотрите, например, общедоступную базу данных (б. д.) по CRISPR на <http://crispr.u-psud.fr/crispr>.

В определенных вариантах осуществления композиций, наборов и способов кодирующая нуклеазу последовательность содержится в векторе для редактирования генов. Вектор для редактирования генов содержит экспрессионную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9.

В контексте данного документа «вектор» представляет собой биологический или химический компонент, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, который можно вносить в подходящую клетку-хозяина для репликации или экспрессии указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Обычные векторы включают невирусные векторы и вирусные векторы. В контексте данного документа невирусная система может быть выбрана из наночастиц, систем электропорации и новых биоматериалов, оголенной ДНК, фага, транспозона, плазмид, космид (Phillip McClean, www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/-plsc731/cloning/cloning4.htm) и искусственных хромосом (Gong, Shiaoqing, et al. "A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes." Nature 425.6961 (2003): 917-925).

В контексте данного документа «экспрессионная кассета» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит биологически применимую последовательность нуклеиновой кислоты (например, генную кДНК, кодирующую белок, фермент или другой применимый генный продукт, мРНК и т. д.), и функционально связанные с ней регуляторные последовательности, которые управляют транскрипцией, трансляцией и/или экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты и ее генного продукта или модулируют их. В контексте данного документа «функционально связанные» последовательности включают как регуляторные последовательности, которые являются непрерывными с последовательностью нуклеиновой кислоты, так и регуляторные последовательности, которые действуют в транс-положении или на расстоянии, регулируя последовательность. Такие регуляторные последовательности, как правило, включают, например, одно или более из промотора, энхансера, интрона, последовательности Козака, последовательности полиаденилирования и сигнала ТАТА. Экспрессионная кассета может содержать регуляторные последовательности выше (5' относительно) последовательности гена, например, одно или более из промотора, энхансера, интрона и т. д., или

регуляторные последовательности ниже (3' относительно) последовательности гена, например, 3' нетранслируемую область, содержащую сайт полиаденилирования, помимо прочих элементов. В других вариантах осуществления термин «трансген» относится к одной или более последовательностям ДНК из экзогенного источника, которые вставлены в клетку-мишень. Как правило, такая экспрессионная кассета для создания вирусного вектора содержит кодирующую последовательность для описанного в данном документе генного продукта, фланкируемую пакующими сигналами вирусного генома и другими последовательностями управления экспрессией, такими как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления векторный ген может содержать две или более экспрессионных кассет.

Помимо кодирующей последовательности для нуклеазы, в определенных вариантах осуществления вектор для редактирования генов содержит регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-хозяине. В определенных вариантах осуществления регуляторные элементы включают промотор. В определенных вариантах осуществления, в которых система сконструирована для лечения метаболических нарушений, характеризуемых мутацией или фенотипом в гепатоцитах, вектор для редактирования генов может быть сконструирован так, чтобы экспрессия нуклеазы происходила под управлением печеночно-специфического промотора. В иллюстративных описанных в данном документе плазмиде и векторе используется печеночно-специфический промотор тироксин-связывающего глобулина (TBG), который характеризуется последовательностью SEQ ID NO: 41. В других вариантах осуществления используют укороченную версию TBG, вариант, называемый в данном документе TBG-S1, который характеризуется последовательностью SEQ ID NO: 11. В другом варианте осуществления используют гибридный печеночный промотор (HLP), имеющий последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления необходимо использовать промотор, имеющий низкую транскрипционную активность, или слабый промотор. В одном варианте осуществления промотор представляет собой ослабленную версию печеночно-специфического промотора тироксин-связывающего глобулина (TBG). В одном варианте осуществления слабый промотор усечен в 5' или 3' конце нативного промотора или последовательности TBG-S1. В другом варианте осуществления в промоторе сохранены только 3' концевые 113 нт из промотора TBG-S1, и он называется F113 (также называется TBG-S1-F113) (SEQ ID NO: 19, нт 206-318). Предварительные заявки на патент США №№ 63/016145, поданная 27 апреля 2020 г., 63/033738, поданная 2 июня 2020 г., и 63/089796, поданная 9 октября 2020 г., PCT/US21/29386 и PCT/US21/29403, обе поданные 27 апреля 2021 г., каждая под названием КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ НУКЛЕАЗЫ И НЕЦЕЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОМОТОРА С НИЗКОЙ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

В альтернативном варианте можно использовать другие печеночно-специфические

промоторы, такие как промотор альфа 1 антитрипсина (A1AT), промотор человеческого альбумина (Miyatake *et al.*, *J. Virol.*, 71:5124-32 (1997)) и промотор сердцевины вируса гепатита В (Sandig *et al.*, *Gene Ther.*, 3:1002-9 (1996), минимальный энхансер/промотор TTR, промотор альфа-антитрипсина, LSP (845 нт). Смотрите, например, базу данных по печеночно-специфическим промоторам, Cold Spring Harbor, <http://rulai.schl.edu/LSPD>. В альтернативном варианте можно использовать другие тканеспецифические промоторы, такие как мышечно-специфические промоторы, такие как промотор мышечной креатининкиназы (МСК) или мышечный гибридный промотор (МН). В альтернативном варианте в векторах, описанных в данном документе, можно использовать другие промоторы, такие как конститутивные промоторы (CMV, CBG, CB7 и т. д.), регулируемые (индуцибельные) промоторы [смотрите, например, WO 2011/126808 и WO 2013/049493, включенные в данный документ посредством ссылки] или промоторы, чувствительные к физиологическим стимулам. Необязательно, если выбирают регулируемую систему, может потребоваться третий вектор для обеспечения регуляторной функции.

Помимо промотора, кассета редактирования генов, экспрессионная кассета и/или вектор могут содержать один или более соответствующих «регуляторных элементов» или «регуляторных последовательностей», которые включают, но не ограничиваются этим, энхансер; фактор транскрипции; терминатор транскрипции; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК, например, посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WHP) (WPRE); последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т. е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, которые повышают секрецию кодируемого продукта. Примеры подходящих последовательностей полиА включают, например, полиА SV40, бычьего гормона роста (bGH) и ТК. Примеры подходящих энхансеров включают, помимо прочего, например, энхансер альфа-фетопротейна, минимальный промотор/энхансер TTR, LSP (промотор ТН-связывающего глобулина/энхансер альфа 1-микроглобулина/бикунина). Эти контрольные последовательности или регуляторные последовательности функционально связаны с кодирующей нуклеазу последовательностью или кодирующей трансген последовательностью.

В определенных вариантах осуществления вектор для редактирования генов содержит промотор TBG, один или более энхансеров альфа mic/bik, кодирующую последовательность для мегануклеазы ARCUS, необязательно WPRE и полиА. В определенных вариантах осуществления экспрессионная кассета содержит нуклеотиды от 211 до 2964 из 2964 SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления компонент редактирования генов дополнительно содержит последовательности, которые направляют нуклеазу к сайту-мишени в целевом локусе PCSK9. В определенных вариантах осуществления, поскольку такая мегануклеаза является специфической в отношении PCSK9, для направления

нуклеазы к сайту-мишени не нужны дополнительные последовательности. Однако в случае, например, Cas9 присутствует дополнительная последовательность, называемая «одиночной гидовой РНК» или «огРНК», которая является специфической в отношении целевой последовательности. огРНК может находиться в том же векторе (цис), что и Cas9, или в другом векторе (транс). В контексте данного документа огРНК имеет последовательность из по меньшей мере 20 оснований (или из около 24-28 оснований, что иногда называется затравочной областью) для специфического связывания ДНК (т. е. является гомологичной целевой ДНК) в комбинации с каркасом огРНК. Транскрипция огРНК должна начинаться точно в ее 5' конце. При нацеливании на матричную цепь ДНК область спаривания оснований огРНК имеет такую же идентичность последовательности, что и транскрибируемая последовательность. При нацеливании на нематричную цепь ДНК область спаривания оснований огРНК является обратно комплементарной транскрибируемой последовательности. Необязательно, вектор для редактирования генов может содержать более одной огРНК. огРНК находится 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается ферментом Cas9 (или Cpf1). Как правило, огРНК находится «непосредственно» 5' относительно последовательности PAM, т. е. спейсер или промежуточные последовательности отсутствуют. В одном варианте осуществления «затравочная» кодирующая последовательность огРНК представляет собой AAGTTGGTCCCCAAAGTCCC (SEQ ID NO: 8), которая применима для нацеливания SaCas9 на экзон 7 PCSK9 человека или макака. При этом специалист в данной области техники может сконструировать и другие огРНК.

В определенных вариантах осуществления огРНК содержит по меньшей мере 20 нуклеотидов и специфически связывается с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9. Затравочная область в некоторых вариантах осуществления имеет 100% комплементарности с сайтом-мишенью в гене PCSK9. В других вариантах осуществления затравочная область содержит 1, 2, 3, 4 или 5 несовпадений по сравнению с сайтом-мишенью.

огРНК находится под управлением промотора и/или терминатора РНК-полимеразы. В определенных вариантах осуществления промотор РНК-полимеразы представляет собой промотор Pol III, такой как промотор U6. В другом варианте осуществления промотор представляет собой промотор H1. Последовательность типового промотора U6 можно найти в SEQ ID NO: 10. В других вариантах осуществления огРНК и промотор РНК-полимеразы находятся в донорном векторе.

В других вариантах осуществления, например, в которых нуклеаза представляет собой Cas9, компонент редактирования генов дополнительно содержит один или более сигналов ядерной локализации (СЯЛ). В одном варианте осуществления СЯЛ фланкирует кодирующую последовательность для Cas9. В определенных вариантах осуществления СЯЛ имеет последовательность из нуклеотидов от 4241 до 4288 из SEQ ID NO: 5.

Смотрите, например, Lu et al. Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus, *Cell Commun Signal* (May 2021) 19:60, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления кодирующая нуклеазу последовательность предоставлена в виде матричной РНК (мРНК). мРНК может содержать 5' нетранслируемую область, 3' нетранслируемую область и/или кодирующую или транслирующую последовательность. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность для Cas9 предоставлена в виде мРНК.

мРНК может представлять собой встречающуюся или не встречающуюся в природе мРНК. мРНК может содержать одно или более модифицированных нуклеоснований, нуклеозидов или нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления мРНК в композициях по изобретению содержит по меньшей мере одну модификацию, которая придает нуклеиновой кислоте повышенную или увеличенную стабильность, например, улучшенную устойчивость к расщеплению нуклеазами *in vivo*. мРНК может содержать любое число пар оснований, включая десятки, сотни или тысячи пар оснований. Любое число (например, все, некоторые или никакие) нуклеоснований, нуклеозидов или нуклеотидов могут быть аналогами канонических молекул, замещенными, модифицированными или иным образом не встречающимися в природе. В определенных вариантах осуществления могут быть модифицированы все нуклеоснования конкретного типа. Например, весь цитозин в мРНК может представлять собой 5-метилцитозин. В контексте данного документа термины «модификация» и «модифицированный», когда они относятся к предложенным в данном документе нуклеиновым кислотам, включают по меньшей мере одно изменение, которое предпочтительно повышает стабильность и делает мРНК более стабильной (например, устойчивой к расщеплению нуклеазами), чем версия мРНК дикого типа или природного происхождения. В контексте данного документа термины «стабильный» и «стабильность», когда они относятся к нуклеиновым кислотам по настоящему изобретению и, в частности, в отношении мРНК, относятся к повышенной или увеличенной устойчивости к разрушению, например нуклеазами (т. е. эндонуклеазами или экзонуклеазами), которые обычно способны разрушать такую мРНК. Повышенная стабильность может включать, например, меньшую чувствительность к гидролизу или другому разрушению эндогенными ферментами (например, эндонуклеазами или экзонуклеазами) или условиям в целевой клетке или ткани, тем самым повышая время нахождения такой мРНК в целевых клетке, ткани, организме субъекта и/или цитоплазме. Стабилизированные молекулы мРНК, предложенные в данном документе, демонстрируют большее время полужизни по сравнению с их встречающимися в природе немодифицированными аналогами (например, версией мРНК дикого типа). Также под терминами «модификация» и «модифицированный», когда они относятся к мРНК по настоящему изобретению, подразумеваются изменения, которые улучшают или повышают трансляцию нуклеиновых кислот мРНК, включая, например, включение

последовательностей, чьей функцией является инициация трансляции белка (например, консенсусной последовательности Козака).

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе мРНК была подвергнута химической или биологической модификации для обеспечения ее большей стабильности. Типовые модификации мРНК включают удаление основания (например, путем делеции или путем замены одного нуклеотида другим) или модификацию основания, например, химическую модификацию основания. В контексте данного документа выражение «химические модификации» включает модификации, которые вносят химические элементы, отличные от присутствующих во встречающейся в природе мРНК, например, ковалентные модификации, такие как внесение модифицированных нуклеотидов (например, нуклеотидных аналогов, или включение подвешенных групп, которые обычно не встречаются в таких молекулах мРНК).

В некоторых вариантах осуществления число остатков С и/или U в последовательности мРНК уменьшено. В другом варианте осуществления число остатков С и/или U уменьшено за счет замещения одного кодона, кодирующего конкретную аминокислоту, другим кодоном, кодирующим такую же или близкую аминокислоту. Предусмотренные модификации нуклеиновых кислот мРНК по настоящему изобретению также включают внесение псевдоуридина (ψ) или 5-метилцитозина (m5C). Замены и модификации мРНК по настоящему изобретению можно осуществлять способами, хорошо известными специалисту в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления мРНК содержит 5' кэп-структуру, терминирующий цепь нуклеотид, структуру типа «стебель - петля» и/или сигнал полиаденилирования. Кэп-структура или кэп-молекула представляет собой соединение, содержащее два нуклеозидных фрагмента, соединенных линкером, и может быть выбрана из встречающегося в природе кэпа, не встречающегося в природе кэпа или кэп-аналога, или анти-обратного кэп-аналога. Вместо этого или в дополнение к этому мРНК может содержать терминирующий цепь нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления мРНК содержит структуру типа «стебель - петля», такую как гистоновая структура типа «стебель - петля». Структура типа «стебель - петля» может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более пар нуклеотидных оснований. Структура типа «стебель - петля» может быть расположена в любой области мРНК. Например, структура типа «стебель - петля» может быть расположена в, до или после нетранслируемой области (5' нетранслируемой области или 3' нетранслируемой области), кодирующей области или последовательности или хвосте полиА.

В определенных вариантах осуществления мРНК содержит последовательность полиА. Последовательность полиА может состоять полностью или главным образом из нуклеотидов аденина или их аналогов или производных. В определенных вариантах осуществления последовательность полиА представляет собой хвост, расположенный смежно с 3' нетранслируемой областью мРНК.

мРНК может кодировать любой представляющий интерес полипептид, например

нуклеазу, включая любой встречающийся или не встречающийся в природе или иным образом модифицированный полипептид. Полипептид, кодируемый мРНК может иметь любой размер и может иметь любую вторичную структуру или активность. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый мРНК, может иметь терапевтический эффект при экспрессии в клетке.

ДОНОРНЫЙ ВЕКТОР

Композиции, наборы и способы включают донорный вектор, который обеспечивает кодирующую последовательность для терапевтического трансгена. В определенных вариантах осуществления донорный вектор содержит экспрессионную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансген, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени. В определенных вариантах осуществления трансген кодирует белок, который aberrантно экспрессируется при метаболическом нарушении со стороны печени или другом генетическом нарушении. Трансген кодирует белок, отличный от PCSK9. Такие белки включают, но не ограничиваются этим, ОТС, рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLr), фактор IX, такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 55 или 56, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, и фактор VIII, такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 53 или 54, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

Дополнительные иллюстративные гены, которые можно доставлять посредством донорного вектора, включают, без ограничения, глюкозо-6-фосфатазу, связанную с болезнью накопления гликогена или дефицитом гликогена типа 1A (GSD1), фосфоенолпируват-карбоксикиназу (PEPCK), связанную с дефицитом PEPCK; подобный циклинзависимым киназам белок 5 (CDKL5), также известный как сериновая/треониновая киназа 9 (STK9), связанная с судорогами и тяжелым нарушением неврологического развития; галактозо-1-фосфатуридилтрансферазу, связанную с галактоземией, такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 63 или 64, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней; фенилаланин-гидроксилазу (ПАН), связанную с фенилкетонурией (ФКУ); генные продукты, связанные с первичной гипероксалурией типа 1, включая гидроксикислую оксидазу 1 (GO/HAO1), такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 49 или 50, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, и AGXT, такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 47 или 48, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, альфа-кетокислую дегидрогеназу с разветвленной цепью, включая BCKDH, BCKDH-E2, BAKDH-E1a и BAKDH-E1b, связанную с болезнью кленового сиропа; фумарилацетоацетат-гидролазу,

связанную с тирозинемией типа 1; метилмалонил-CoA мутазу, связанную с метилмалоновой ацидезией; среднепечочную ацил-CoA-дегидрогеназу, связанную с дефицитом среднепечочного ацил-CoA; орнитинтранскарбамилазу (OTC), связанную с дефицитом орнитинтранскарбамилазы; аргинин-янтарнокислую синтетазу (ASS1), такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 69 или 70, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, связанную с цитруллинемией; дефицитом лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (LCAT); метилмалоновой ацидезией (MMA); NPC1, связанный с болезнью Ниманна - Пика типа C1); пропионовой ацидезией (PA); белок рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR), связанный с семейной гиперхолестеринемией (FH), такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 73 или 74, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, вариант LDLR, такой как описанные в WO 2015/164778, или имеющий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: или последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней; белки ApoE и ApoC, связанные с деменцией; липопротеинлипазу (LPL) (дефицит липопротеинлипазы), такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 67 или 68, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, UDP-глюконозилтрансферазу, связанную с болезнью Криглера - Найяра; аденозиндезаминазу, связанную с тяжелым комбинированным иммунодефицитом; гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу, связанную с подагрой и синдромом Леша - Найхана; биотимидазу, связанную с дефицитом биотимидазы; альфа-галактозидазу A (α -Gal A) связанную с болезнью Фабри, такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 75 или 76, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней; бета-галактозидазу (GLB1), связанную с ганглиозидозом GM1; АТР7В, связанный с болезнью Вильсона; бета-глюкоцереброзидазу, связанную с болезнью Гоше типа 2 и 3, такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 51 или 52, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней; 70 кДа пероксисомный мембранный белок, связанный с синдромом Цельвегера; арилсульфатазу А (ARSA), связанную с метахроматической лейкодистрофией, фермент галактоцереброзидазу (*GALC*), связанную с болезнью Краббе, альфа-глюкозидазу (*GAA*), связанную с болезнью Помпе, такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 79 или 80, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней; ген сфингомиелиназы (*SMPD1*), связанной с болезнью Ниманна - Пика типа А; карнозиназу (*CN1*); гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу (*HGPRT*); эритропоэтин (*EPO*); карбамилфосфатсинтетазу (*CPS1*), N-ацетилглутаматсинтетазу

(NAGS); аргининосукцинатлиазу (ASL) (аргининосукцинурия), такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 57 или 58, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней; и аргиназу (AG); аргининосукцинатсинтазу, связанную с цитруллинемией типа II с началом во взрослом возрасте (CTLN2) (WO 2018/144709, которая включена в данный документ посредством ссылки); карбамоилфосфатсинтазу 1 (CPS1), связанную с нарушениями цикла мочевины; белок выживаемости мотонейронов (SMN), связанный со спинальной мышечной атрофией; церамидазу, связанную с липогранулематозом Фарбера; b-гексозаминидазу, связанную с ганглиозидозом GM2 и болезнями болезнь Тея - Сакса и Сандхоффа; аспартилглюкозаминидазу, связанную с аспартилглюкозаминурией; α -фукозидазу, связанную с фукозидозом; α -маннозидазу, связанную с альфа-маннозидозом; порфобилиногендезаминазу, связанную с острой перемежающейся порфирией (AIP); альфа-1 антитрипсин для лечения дефицита альфа-1 антитрипсина (эмфиземы), такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 77 или 78, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней; эритропоэтин для лечения анемии вследствие талассемии или почечной недостаточности; фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтин-1 и фактор роста фибробластов для лечения ишемических заболеваний; тромбомодулин и ингибитор пути тканевого фактора для лечения закупоренных кровеносных сосудов, например, при атеросклерозе, тромбозе или эмболизме; ароматическую аминокислотную декарбоксилазу (AADC) и тирозингидроксилазу (TH) для лечения болезни Паркинсона; бета-адренергический рецептор, антисмысловый относительно фосфоламбана или являющийся его мутантной формой, аденозинтрифосфатазу-2 сарко(эндо)плазматического ретикулума (SERCA2) и сердечную аденилатциклазу для лечения врожденного порока сердца; ген-супрессор опухолей, такой как p53, для лечения различных видов рака; цитокин, такой как один из ряда интерлейкинов, для лечения воспалительных и иммунных нарушений и рака; дистрофин или минидистрофин и атрофин или миниатрофин для лечения мышечных дистрофий; и инсулин или GLP-1 для лечения сахарного диабета.

Примеры подходящих трансгенов для доставки включают, например, связанные с семейной гиперхолестеринемией (например, VLDLr, LDLr, ApoE, смотрите, например, WO 2020/132155, WO 2018/152485, WO 2017/100682, которые включены в данный документ посредством ссылки), мышечной дистрофией, муковисцидозом и редкими или орфанными заболеваниями. Примеры таких редких заболеваний могут включать, помимо прочего, спинальную мышечную атрофию (СМА), болезнь Хантингтона, синдром Ретта (например, метил-СрG-связывающий белок 2 (MeCP2); UniProtKB - P51608), боковой амиотрофический склероз (БАС), мышечную дистрофию Дюшена, атаксию Фридрикса (например, фратаксин), програнулин (PRGN) (связанный с отличной от болезни Альцгеймера дегенерацией головного мозга, включая лобно-височную деменцию (ЛВД),

прогрессирующую небеглую афазию (ПНБА) и семантическую деменцию). Другие применимые генные продукты включают карбамоилсинтетазу I, орнитинтранскарбамилазу (ОТС), аргининосукцинатсинтетазу, аргининосукцинатлиазу (ASL) для лечения дефицита аргининосукцинатлиазы, аргиназу, фумарилацетатгидролазу, фенилаланингидроксилазу, альфа-1 антитрипсин, альфа-фетопроtein резуса (AFP), хорионический гонадотропин резуса (CG), глюкозо-6-фосфатазу, такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 59 или 60, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, ингибитор плазменной протеазы C1 (SERPING1), связанный с наследственным ангионевротическим отеком, такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 61 или 62, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, порфобилиногендезаминазу, цистатион бета-синтазу, связанную с гомоцистинурией, такую как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 65 или 66, или последовательность, имеющая по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, кетокислую дегидрогеназу с разветвленной цепью, альбумин, изовалерил-соА-дегидрогеназу, пропионил-СоА-карбоксилазу, метилмалонил-СоА-мутазу, глутарил-СоА-дегидрогеназу, инсулин, бета-глюкозидазу, пируваткарбоксилазу, печеночную фосфорилазу, киназу фосфорилазы, глициндекарбоксилазу, Н-белок, Т-белок, последовательность муковисцидозного трансмембранного регулятора (CFTR) и генный продукт дистрофина [например, мини-или микродистрофин]. Другие применимые генные продукты включают ферменты, которые могут быть полезны в ферментозаместительной терапии, которая применима при ряде состояний, возникающих в результате дефицита фермента. Например, ферменты, который содержат маннозо-6-фосфат, можно использовать в терапии для лизосомальных болезней накопления (например, подходящий ген включает кодирующий β -глюкуронидазу (GUSB)). Примеры подходящего трансгена для доставки могут включать человеческий фратаксин, доставляемый в AAV-векторе, как описано, например, в PCT/US20/66167, 18 декабря 2020 г., предварительной заявке на патент США № 62/950834, поданной 19 декабря 2019 г., и предварительной заявке на патент США № 63/136059, поданной 11 января 2021 г., которые включены в данный документ посредством ссылки. Другой пример подходящего трансгена для доставки включает человеческую кислую α -глюкозидазу (GAA), доставляемую в AAV-векторе, как описано, например, в PCT/US20/30493, 30 апреля 2020 г., опубликованной на данный момент как WO2020/223362A1, PCT/US20/30484, 20 апреля 2020 г., опубликованной на данный момент как WO 2020/223356 A1, предварительной заявке на патент США № 62/840911, поданной 30 апреля 2019 г., предварительной заявке США № 62.913401, поданной 19 октября 2019 г., предварительной заявке на патент США № 63/024941, поданной 14 мая 2020 г., и предварительной заявке на патент США № 63/109677, поданной 4 ноября 2020 г., которые включены в данный документ посредством ссылки. Также другой пример

подходящего трансгена для доставки может включать человеческую α -L-идуронидазу (IDUA), доставляемую в AAV-векторе, как описано, например, в PCT/US2014/025509, 13 марта 2014 г., опубликованной на данный момент как WO 2014/151341, и предварительной заявке на патент США № 61/788724, поданной 15 марта 2013 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

Другие применимые терапевтические продукты включают экспрессируемые в мышцах, включая сердечную мышцу. Другие применимые терапевтические продукты, кодируемые трансгеном, включают гормоны и факторы роста и дифференцировки, включая, без ограничения, инсулин, глюкагон, глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), гормон роста (GH), паратиреоидный гормон (PTH), фактор, высвобождающий гормон роста (GRF), фолликулостимулирующий гормон (FSH), лютеинизирующий гормон (LH), человеческий хорионический гонадотропин (hCG), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтины, ангиостатин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), эритропоэтин (EPO), фактор роста соединительной ткани (CTGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), кислый фактор роста фибробластов (aFGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста α (TGF α), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), факторы роста инсулина I и II (IGF-I и IGF-II), любой из суперсемейства трансформирующих факторов роста β , включая TGF β , активины, ингибины или любой из костных морфогенетических белков (BMP) BMP 1-15, любой из семейства факторов роста херегулина/нейрегулина/ARIA/фактора дифференцировки *neu* (NDF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофины NT-3 и NT-4/5, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), нейротурин, агрин, любой из семейства семафоринов/коллапсинов, нетрин-1 и нетрин-2, фактор роста гепатоцитов (HGF), эфрины, ноггин, белок «sonic hedgehog» и тирозингидроксилазу. Другие трансгены, применимые в данном документе, включают подходящие для лечения мукополисахаридоза типа I-VII (IDUA, IDS, GNA, HGSNAT, NAGLU, SGSH, GALNS, GLB1, ARSB, GUSB). Типовые последовательности, применимые для лечения МПСI, можно найти в WO 2019/010335, которая включена в данный документ посредством ссылки. Типовые последовательности, применимые для лечения МПСII, можно найти в WO 2019/060662, которая включена в данный документ посредством ссылки. Типовые последовательности, применимые для лечения МПСIIIa, можно найти в WO 2019/108857, которая включена в данный документ посредством ссылки. Типовые последовательности, применимые для лечения МПСIIIb, можно найти в WO 2019/108856, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления трансгенная кассета содержит промотор, кодирующую трансген последовательность и последовательность поли А. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой печеночно-специфический промотор, такой как промотор TBG, промотор TBG-S1, промотор HLP или другие, описанные в данном документе. В других вариантах осуществления трансген

предоставлен без промотора и вставлен в геном ниже нативного промотора PCSK9.

Трансгенная кассета, экспрессионная кассета и/или вектор (для редактирования или донорный) могут содержать один или более соответствующих «регуляторных элементов» или «регуляторных последовательностей», которые включают, но не ограничиваются этим, энхансер; фактор транскрипции; терминатор транскрипции; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК, например, посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WHP) (WPRE); последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т. е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, которые повышают секрецию кодируемого продукта. Примеры подходящих последовательностей полиА включают, например, полиА SV40, бычьего гормона роста (bGH) и ТК. Примеры подходящих энхансеров включают, помимо прочего, например, энхансер альфа-фетопroteина, минимальный промотор/энхансер TTR, LSP (промотор ТН-связывающего глобулина/энхансер альфа 1-микроглобулина/бикунина). Эти контрольные последовательности или регуляторные последовательности функционально связаны с кодирующими нуклеазу последовательностями или кодирующей трансген последовательностью.

Помимо трансгенной кассеты, в определенных вариантах осуществления донорный вектор также содержит плечи обусловленной гомологией рекомбинации (HDR) 5' и 3' относительно трансгенной кассеты для облегчения обусловленной гомологией рекомбинации трансгена в эндогенный геном. Плечи гомологии направлены на целевой локус PCSK9 и могут иметь разную длину. В некоторых вариантах осуществления длина каждого из плеч HDR составляет от около 100 п. о. до около 1000 п. о. В других вариантах осуществления каждое из плеч HDR составляет от около 130 п. о. до около 500 п. о. В других вариантах осуществления каждое из плеч HDR составляет от около 100 п. о. до около 300 п. о. В других вариантах осуществления каждое из плеч HDR составляет от около 100 п. о. до около 400 п. о. В других вариантах осуществления каждое из плеч HDR составляет от около 250 п. о. до около 500 п. о. В других вариантах осуществления каждое из плеч HDR составляет от около 300 п. о. до около 500 п. о. В определенных вариантах осуществления каждое из плеч HDR составляет около 100 п. о., 125 п. о., 150 п. о., 175 п. о., 200 п. о., 225 п. о., 250 п. о., 275 п. о., 300 п. о., 325 п. о., 350 п. о., 375 п. о., 400 п. о., 425 п. о., 450 п. о., 450 п. о., 475 п. о. или 500 п. о. В одном варианте осуществления плечо HDR составляет 130 п. о. В другом варианте осуществления плечо HDR составляет 137 п. о. В другом варианте осуществления плечи HDR составляют от около 130 п. о. до 140 п. о. В другом варианте осуществления плечи HDR составляют около 500 п. о. В другом варианте осуществления плечи HDR отсутствуют. В идеале, плечи HDR имеют высокий уровень комплементарности с целевым локусом PCSK9, хотя это не должна быть 100% комплементарность. В некоторых вариантах осуществления в каждом плече HDR

допустимы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более несовпадений. Подходящие последовательности плеч HDR для нацеливания на экзон 7 PCSK9 приведены в SEQ ID NO: 24-29. В одном варианте осуществления последовательности плеч HDR выбраны из SEQ ID NO: 24-29.

Также в данном документе предложены композиции, наборы и способы для опосредованной нуклеазой сайт-специфической интеграции кассеты трансгена ОТС в безопасный приемный сайт PCSK9 в геноме, что обеспечивает долгосрочную терапевтическую пользу для пациентов с дефицитом ОТС. Предложена сконструированная кодирующая последовательность для ОТС, называемая в данном документе hОТСco2 и приведенная в SEQ ID NO: 17. Предложены нуклеиновые кислоты, имеющие последовательность SEQ ID NO: 17 или последовательности, имеющие по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,9% идентичности с ней. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота имеет менее 80%, менее 79%, менее 78%, менее 77%, менее 76%, менее 75%, менее 74%, менее 73%, менее 72%, менее 71% или менее 70% идентичности с нативной кодирующей последовательностью ОТС, которая приведена в SEQ ID NO: 30.

Другие последовательности, применимые для лечения дефицита ОТС, описаны в WO 2015/138348 и WO 2015/138357, которые включены в данный документ посредством ссылки. Иллюстративные последовательности, применимые для лечения РКU, описаны в WO 2018/126112, которая включена в данный документ посредством ссылки. Другие последовательности приведены в SEQ ID NO: 71 или 72, или это последовательности, имеющие по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

ВИРУСНЫЕ И НЕВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

Экспрессионные кассеты (для редактирования генов и донорные) или кодирующие последовательности, описанные в данном документе, можно конструировать в любом подходящем генетическом элементе, таком как вектор, для доставки в клетку-мишень, например клетку печени. В контексте данного документа «вектор» представляет собой биологический или химический компонент, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, который можно вносить в подходящую клетку-хозяина для репликации или экспрессии указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Обычные векторы включают невирусные векторы и вирусные векторы. В контексте данного документа невирусная система может быть выбрана из наночастиц, систем электропорации и новых биоматериалов, оголенной ДНК, фага, транспозона, плазмид, космид (Phillip McClean, www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/-plsc731/cloning/cloning4.htm) и искусственных хромосом (Gong, Shiaoqing, et al. "A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes." *Nature* 425.6961 (2003): 917-925). В одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту доставляют с помощью невирусного вектора или липидной наночастицы, как описано в данном документе или известно в данной области

техники.

В определенных вариантах осуществления компонент редактирования генов инкапсулирован в липидной наночастице (ЛНЧ). Смотрите, например, Conway et al, Non-viral Delivery of Zinc Finger Nuclease mRNA Enables Highly Efficient In Vivo Genome Editing of Multiple Therapeutic Gene Targets, *Molecular Therapy*, 27(4):866-877 (апрель 2019 г.), которая включена в данный документ посредством ссылки). В контексте данного документа выражение «липидная наночастица» относится к средству переноса, содержащему один или более липидов (например, катионных липидов, некатионных липидов и ПЭГ-модифицированных липидов). Предпочтительно липидные наночастицы составлены для доставки одной или более мРНК в одну или более клеток-хозяев (например, в печени и/или мышцах). Примеры подходящих липидов включают, например, фосфатидильные соединения (например, фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды). Также предусмотрено применение полимеров в качестве средств переноса, отдельно или в комбинации с другими средствами переноса. Подходящие полимеры могут включать, например, полиакрилаты, полиалкилцианоакрилаты, полилактид, сополимеры полилактид - полигликолид, поликапролактоны, декстран, альбумин, желатин, альгинат, коллаген, хитозан, циклодекстрины, дендримеры и полиэтиленимин. В одном варианте осуществления средство переноса выбрано на основании его способности упрощать трансфекцию мРНК в клетку-хозяина. Применимые липидные наночастицы для мРНК содержат катионный липид для инкапсуляции мРНК и/или повышения доставки мРНК в клетку-хозяина, которая будет действовать как депо для выработки белка. В контексте данного документа выражение «катионный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые несут положительный суммарный заряд при выбранном рН, таком как физиологический рН. Предусмотренные липидные наночастицы можно получать путем включения многокомпонентных липидных смесей с различными соотношениями с использованием одного или более катионных липидов, некатионных липидов и ПЭГ-модифицированных липидов. Некоторые катионные липиды были описаны в литературе, причем многие из них коммерчески доступны. Смотрите, например, WO2014/089486, US 2018/0353616A1 и US 8853377B2, которые включены посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления составление ЛНЧ проводят, используя рутинные процедуры, включающие применение холестерина, ионизируемого липида, вспомогательного липида, ПЭГ-липиды и полимера для образования липидного бислоя вокруг инкапсулированных нуклеиновых кислот (Kowalski et al., 2019, *Mol. Ther.* 27(4):710-728). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид (т. е. N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N, N, N-триметиламмония хлорид (DOTMA) или 1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан (DOTAP)) со вспомогательным липидом DOPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит ионизируемые липиды Dlin-MC3-DMA или ионизируемые липиды на основе дикетопиперазина (сКК-E12). В некоторых вариантах осуществления полимер содержит полиэтиленимин (ПЭИ) или сложные

поли(β-амино)эфир (ПБАЭ). Смотрите, например, WO2014/089486, US 2018/0353616A1, US2013/0037977A1, WO2015/074085A1, US9670152B2 и US 8853377B2, которые включены посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления, в которых компонент редактирования генов содержит мРНК Cas9, ЛНЧ также содержит гРНК.

Определенные ЛНЧ, применимые в данном документе, включают описанные в WO 2021/077066 и WO 2021/055892, каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Применимые ЛНЧ включают те, которые демонстрируют повышенную доставку в печень. Составы ЛНЧ можно варьировать для повышения доставки в печень. Например, можно варьировать тип и соотношение ионизируемый липид:мРНК, соотношение мРНК:огРНК, молярное соотношение ионизируемого липида, фосфолипид, холестерина и ПЭГ-липид и т. д. В одном варианте осуществления ЛНЧ представляет собой описанную в Kauffman, K. J.; Dorkin, J. R.; Yang, J. H.; Heartlein, M. W.; DeRosa, F.; Mir, F. F.; Fenton, O. S.; Anderson, D. G., Optimization of lipid nanoparticle formulations for mRNA delivery in vivo with fractional factorial and definitive screening designs. Nano letters 2015, 15 (11), 7300-7306, которая включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления ЛНЧ сконструированы с массовым соотношением ионизируемый липид:мРНК в диапазоне от 5:1 до 25:1. В определенных вариантах осуществления массовое соотношение ионизируемый липид:мРНК составляет 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 12.5:1, 15:1, 20:1 или 25:1. В определенных вариантах осуществления массовое соотношение мРНК:огРНК составляет 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 1:5, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

Были описаны другие ЛНЧ, которые также применимы в данном документе. Смотрите, например, WO 2016/118724, US 10413618B2, US 10723692B2 и US8754062B2, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых примерах в данном документе проиллюстрированы AAV-векторы, содержащие кодирующую последовательность компонента редактирования генов (нуклеазы) и кодирующие последовательности трансгена в AAV-векторном геноме. Однако применение конструкций, описанных в данном документе, не ограничено AAV-конструкциями и может быть применено для других векторов. В определенных вариантах осуществления векторный геном может быть упакован в отличный вектор (например, рекомбинантный бокавирус). В определенных вариантах осуществления экспрессионная кассета может быть упакована в отличный вирусный вектор, в невирусный вектор и/или в другую систему доставки. В определенных вариантах осуществления компонент редактирования генов находится в ЛНЧ.

«Плаزمида» или «плазмидный вектор» в общем случае обозначена в данном документе с помощью маленькой буквы «р», которая находится перед названием вектора и/или после него. Плазмиды, другие клонирующие и экспрессионные векторы, их свойства и способы конструирования/манипуляции, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, очевидны для специалистов в данной области техники. В одном варианте осуществления описанную в данном документе

последовательность нуклеиновой кислоты или описанную в данном документе экспрессионную кассету конструируют в подходящем генетическом элементе (векторе), применимом для создания вирусных векторов и/или для доставки в клетку-хозяина, например, оголенной ДНК, фаге, транспозоне, космиде, эписоме и т. д., который переносит содержащиеся в нем последовательности нуклеазы. Выбранный вектор можно доставлять любым подходящим способом, включая трансфекцию, электропорацию, липосомную доставку, методики мембранного слияния, высокоскоростные покрытые ДНК пеллеты, вирусное инфицирование и слияние протопластов. Способы, используемые для создания таких конструкций, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают генетическую инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методики. Смотрите, например, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

В определенных вариантах осуществления экспрессионная кассета находится в векторном геноме для упаковки в вирусный капсид. Например, в случае AAV-векторного генома компоненты экспрессионной кассеты фланкируются в самом 5' конце и самом 3' конце последовательностями инвертированных концевых повторов AAV. Например, 5' ИКП AAV, экспрессионная кассета, 3' ИКП AAV. В других вариантах осуществления можно выбрать самокомплементарный AAV. В других вариантах осуществления можно использовать ретровирусную систему, лентивирусную векторную систему или аденовирусную систему.

AAV-ВЕКТОРЫ

В определенных вариантах осуществления вектор для редактирования генов и/или донорный вектор предоставлен в виде рекомбинантного AAV. «Рекомбинантный AAV» или «гAAV» представляет собой устойчивую к ДНКазе вирусную частицу, содержащую два элемента, капсид AAV и векторный геном, содержащий по меньшей мере отличную от AAV кодирующую последовательность, упакованную с капсидом AAV. Если не указано иное, этот термин можно взаимозаменяемо использовать с выражением «гAAV-вектор» или «AAV-вектор». гAAV представляет собой «дефективный по репликации вирус» или «вирусный вектор», поскольку в нем отсутствует какой-либо функциональный ген гер AAV или функциональный ген сар AAV, и он не может давать потомство. В определенных вариантах осуществления единственными последовательностями AAV являются последовательности инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV, как правило, расположенные, с самого края 5' и 3' концов векторного генома для обеспечения упаковки генных и регуляторных последовательностей, расположенных между ИКП, в капсид AAV.

Источникам капсида AAV может быть любой из множества встречающихся в природе и доступных аденоассоциированных вирусов, а также сконструированные AAV. Источник капсида AAV для вектора для редактирования генов и/или донорного вектора, в одном варианте осуществления, является одинаковым. В другом варианте осуществления источник капсида AAV для вектора для редактирования генов и/или донорного вектора

является разным. Аденоассоциированный (AAV) вирусный вектор представляет собой устойчивую к ДНКазе AAV-частицу, имеющую белковый капсид AAV, в который упакованы последовательности нуклеиновой кислоты для доставки в клетки-мишени. Капсид AAV состоит из 60 капсидных (ср) белковых субъединиц, VP1, VP2 и VP3, которые расположены в икосаэдральной симметрии в соотношении приблизительно от 1:1:10 до 1:1:20 в зависимости от выбранного AAV. Различные AAV можно выбирать в качестве источников для капсидов AAV вирусных векторов, как указано выше. Смотрите, например, опубликованную заявку на патент США № 2007-0036760-A1; опубликованную заявку на патент США № 2009-0197338-A1; EP 1310571. Также смотрите WO 2003/042397 (AAV7 и другие AAV обезьян), патент США 7790449 и патент США 7282199 (AAV8), WO 2005/033321 и US 7906111 (AAV9), а также WO 2006/110689, WO 2003/042397 (rh.10) и WO 2018/160582 (AAVhu68). В этих документах также описаны другие AAV, которые можно выбирать для создания AAV, и включены посредством ссылки.

Если не указано иное, капсид, ИКП AAV и другие выбранные компоненты AAV, описанные в данном документе, можно выбирать из любых AAV, включая, без ограничения, AAV, обычно обозначаемые как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV8bp, AAV7M8, AAVAnc80, AAVrh10, AAVrh79 и AAVPHP.B, и варианты любого из известных или упомянутых AAV, или AAV, которые будут открыты в будущем, или их варианты или смеси. Смотрите, например, WO 2005/033321, которая включена в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAV1 или его вариант, капсид AAV8 или его вариант, капсид AAV9 или его вариант, капсид AAVhu.68 или его вариант, капсид AAVrh.10 или его вариант, капсид AAVrh64R1 или его вариант, капсид AAVhu.37 или его вариант или капсид AAV3B или его вариант. В одном аспекте капсид представляет собой капсид AAVhu.37. Также смотрите WO 2019/168961 и WO 2019/169004, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. В других вариантах осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAVrh79 или его вариант. В других вариантах осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAVrh.90 или его вариант.

В определенных вариантах осуществления rAAV содержит капсид AAVhu37. Капсид AAVhu37 содержит: гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно аминокислот от 138 до 738 SEQ ID NO: 38, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 204 до 738 SEQ ID NO: 38, при этом: белки vp1, vp2 и vp3 содержат популяцию с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два аспарагина (N) с высокой степенью дезамидирования в парах аспарагин - глицин в SEQ ID

NO: 38, и необязательно дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к изменению аминокислоты. AAVhu37 характеризуется наличием остатков с высокой степенью дезамидирования, например, в позициях N57, N263, N385 и/или N514 на основании нумерации VP1 AAVhu37 (SEQ ID NO: 38).

Дезамидирование может наблюдаться в других остатках, как показано в таблице ниже и, например, в WO 2019/168961, опубликованной 6 сентября 2019 г., которая включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления капсид AAVhu37 модифицирован в одной или более из следующих позиций в диапазонах, приведенных ниже, по определению методом масс-спектрометрии ферментом трипсином. В определенных вариантах осуществления одна или более из следующих позиций или глицин после N модифицированы, как описано в данном документе. Например, в определенных вариантах осуществления G может быть модифицирован на S или A, например, в позиции 58, 264, 386 или 515. В одном варианте осуществления капсид AAVhu37 модифицирован в позиции N57/G58 на N57Q или G58A для получения капсида с меньшим дезамидированием в этой позиции. В другом варианте осуществления N57/G58 изменены на NS57/58 или NA57/58. При этом в определенных вариантах осуществления наблюдается повышение дезамидирования, когда NG изменен на NS или NA. В определенных вариантах осуществления N пары NG модифицирован на Q с сохранением G. В определенных вариантах осуществления обе аминокислоты пары NG модифицированы. В определенных вариантах осуществления N385Q приводит к существенному снижению дезамидирования в этом положении. В определенных вариантах осуществления N499Q приводит к существенному повышению дезамидирования в этом положении.

В определенных вариантах осуществления AAVhu37 может иметь эти или другие дезамидированные остатки, например, как правило, менее чем в 10%, и/или может иметь другие модификации, включая метилирование (например, ~R487) (как правило, менее чем 5%, чаще менее чем 1% в заданном остатке), изомеризацию (например, в D97) (как правило, менее чем 5%, чаще менее чем 1% в заданном остатке), фосфорилирование (например, при наличии, в диапазоне от около 10 до около 60%, или от около 10 до около 30%, или от около 20 до около 60%) (например, в одном или более из S149, ~S153, ~S474, ~T570, ~S665) или окисление (например, в одном или более из W248, W307, W307, M405, M437, M473, W480, W480, W505, M526, M544, M561, W621, M637 и/или W697). Необязательно, W может окисляться до кинуренина.

| ТАБЛИЦА А | |
|--|--|
| Дезамидирование AAVhu37 на основании нумерации VP1 | % дезамидирования |
| N57+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |

| ТАБЛИЦА А | |
|--|--|
| Дезамидирование AAVhu37 на основании нумерации VP1 | % дезамидирования |
| N94+дезамидирование | 5-15, около 10 |
| ~N254+дезамидирование | 10-20 |
| ~N263+дезамидирование | 75-100 |
| ~N305+дезамидирование | 1-5 |
| ~N385+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| ~N410+дезамидирование | 1-25 |
| N479+дезамидирование | 1-5, 1-3 |
| ~N514+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| ~Q601+дезамидирование | 0-1 |
| N653+дезамидирование | 0-2 |

Другие позиции также могут иметь эти или другие модификации (например, ацетилирование или дополнительное дезамидирование). В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок vp1 капсида AAVhu37, приведена в SEQ ID NO: 37. В других вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты с от 70% до 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 37 может быть выбрана для экспрессии белков капсида AAVhu37. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты является по меньшей мере на около 75% идентичной, по меньшей мере на 80% идентичной, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% идентичной или по меньшей мере на 99% идентичной SEQ ID NO: 37. При этом другие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, могут быть выбраны для применения в получении капсидов rAAVhu37. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 37 или последовательность, от по меньшей мере на 70% до по меньшей мере на 99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную с SEQ ID NO: 37, которая кодирует SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 37 или последовательность, на по меньшей мере от 70% до 99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере

мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную нуклеотидам от около 412 до около 2214 из SEQ ID NO: 37, которая кодирует белок капсида vp2 (приблизительно аминокислоты от 138 до 738) с SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты от около нуклеотида 610 до около нуклеотида 2214 из SEQ ID NO: 37 или последовательность, на по меньшей мере от 70% до 99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную с нуклеотидами SEQ ID NO: 37, которая кодирует белок капсида vp3 (приблизительно аминокислоты от 204 до 738) с SEQ ID NO: 38. Смотрите EP 2 345 731 B1 и SEQ ID NO: 88 в нем, которые включены посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления гAAV содержит капсид AAV8. Капсид AAV8 содержит: гетерогенную популяцию изоформ VP, которые являются дезамидированными по определению в следующей таблице на основании общего количества белков VP в капсиде по определению методом масс-спектрометрии. Подходящие модификации включают описанную в параграфе выше меченную модуляцию дезамидирования, что включено в данный документ. В определенных вариантах осуществления капсид AAV модифицирован в одной или более из следующих позиций в диапазонах, приведенных ниже, по определению методом масс-спектрометрии. В определенных вариантах осуществления одна или более из следующих позиций или глицин после N модифицированы, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления искусственный NG внесен в позицию, отличную от позиций, определенных ниже. В определенных вариантах осуществления одна или более из следующих позиций или глицин после N модифицированы, как описано в данном документе. Например, в определенных вариантах осуществления G может быть модифицирован на S или A, например, в позиции 58, 67, 95, 216, 264, 386, 411, 460, 500, 515 или 541. Существенное снижение дезамидирования наблюдается, когда NG57/58 изменены на NS 57/58 или NA57/58. При этом в определенных вариантах осуществления наблюдается повышение дезамидирования, когда NG изменен на NS или NA. В определенных вариантах осуществления N пары NG модифицирован на Q с сохранением G. В определенных вариантах осуществления обе аминокислоты пары NG модифицированы. В определенных вариантах осуществления N385Q приводит к существенному снижению дезамидирования в этом положении. В определенных вариантах осуществления N499Q приводит к существенному повышению дезамидирования в этом положении. В определенных вариантах осуществления мутацию NG проводят в паре, расположенной в N263 (например, на N263A). В определенных вариантах осуществления мутацию NG проводят в паре, расположенной в N514 (например, на N514A). В определенных вариантах осуществления мутацию NG проводят в паре, расположенной в N540 (например, N540A). В определенных вариантах осуществления конструируют мутантные AAV, содержащие множественные мутации, и

по меньшей мере одну из мутаций в этих позициях. В определенных вариантах осуществления в позиции N57 не создают мутацию. В определенных вариантах осуществления в позиции N94 не создают мутацию. В определенных вариантах осуществления в позиции N305 не создают мутацию. В определенных вариантах осуществления в позиции G386 не создают мутацию. В определенных вариантах осуществления в позиции Q467 не создают мутацию. В определенных вариантах осуществления в позиции N479 не создают мутацию. В определенных вариантах осуществления в позиции N653 не создают мутацию. В определенных вариантах осуществления капсид модифицирован для снижения количества «N» или «Q» в позициях, отличных от пар «NG». Номера остатков основаны на опубликованной последовательности AAV8, воспроизведенной в SEQ ID NO: 36.

| ТАБЛИЦА В | |
|---|--|
| Модификация AAV8 на основании нумерации VP1 | % |
| N35+дезамидирование | 1 |
| N57+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| N66+дезамидирование | 0-10 |
| N94+дезамидирование | 1-15 |
| N113+дезамидирование | 0-10 |
| ~Q166+дезамидирование | 0-10 |
| ~N173+дезамидирование | 0-10 |
| N254/N255+дезамидирование | 5-45 |
| N263+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| ~N304+дезамидирование | 0-10 |
| ~N305+дезамидирование | 10-40 |
| N320+дезамидирование | 0-10 |
| ~Q322+дезамидирование | 0-10 |
| N385+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| N410+дезамидирование | 15-70 |
| ~Q431+дезамидирование | 0-10 |
| N438+дезамидирование | 0-10 |
| ~N459+дезамидирование | 0-10 |
| ~Q467+дезамидирование | 0-10 |

| | |
|---------------------------|--|
| ~N479+дезамидирование | 0-10 |
| N498/N499+дезамидирование | 0-10 |
| N502+дезамидирование | 0-10 |
| N514+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| N517+дезамидирование | 15-40 |
| N540+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| ~N554+дезамидирование | 0-10 |
| ~Q589+дезамидирование | 0-10 |
| ~N590+дезамидирование | 0-10 |
| ~N599+дезамидирование | 35-75 |
| ~Q601+дезамидирование | 45-75 |
| ~Q610+дезамидирование | 0-10 |
| Q617+дезамидирование | 0-10 |
| N630+дезамидирование | 5-30 |
| Q648+дезамидирование | 0-10 |
| N653+дезамидирование | 0-10 |
| N665+дезамидирование | 5-30 |
| N670+дезамидирование | 0-10 |
| N693+дезамидирование | 0-10 |
| ~N706+дезамидирование | 0-10 |
| N718+дезамидирование | 0-10 |
| N737+дезамидирование | 0-10 |

В определенных вариантах осуществления капсид гAAV включает капсид AAVrh79, описанный в WO 2019/169004, опубликованной 6 сентября 2019 г., которая включена в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления капсид AAVrh79 содержит гетерогенную популяцию белков vp1 AAVrh79, белков vp2 AAVrh79 и белков vp3 AAVrh79. В одном варианте осуществления капсид AAVrh79 получают путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 738 SEQ ID NO: 34. Необязательно, последовательности, коэкспрессирующие белок vp3 из последовательности нуклеиновой кислоты за исключением vp1-уникальной области (аминокислоты приблизительно от 1 до 137) или vp2-уникальной области (аминокислоты приблизительно от 1 до 203), белки vp1, полученные из SEQ ID NO: 33, или белки vp1,

полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 33, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 738 SEQ ID NO: 34. В других вариантах осуществления белки vp2 AAVrh79, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность из по меньшей мере аминокислот приблизительно от 138 до 738 SEQ ID NO: 34, белки vp2, полученные из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 412 до 2214 SEQ ID NO: 33, или белки vp2, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2214 SEQ ID NO: 33, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность из по меньшей мере аминокислот от 138 до 738 SEQ ID NO: 34, белки vp3 AAVrh79, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность из по меньшей мере аминокислот приблизительно от 204 до 738 SEQ ID NO: 34, белки vp3, полученные из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 610 до 2214 SEQ ID NO: 33, или белки vp3, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 610 до 2214 SEQ ID NO: 33, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность из по меньшей мере аминокислот от 204 до 738 SEQ ID NO: 34.

В определенных вариантах осуществления капсид AAVrh79 содержит: гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно аминокислот от 138 до 738 SEQ ID NO: 34, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 204 до 738 SEQ ID NO: 34.

белки vp1, vp2 и vp3 AAVrh79 содержат популяцию с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два аспарагина (N) с высокой степенью дезамидирования в парах аспарагин - глицин в SEQ ID NO: 34, и необязательно дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к изменению аминокислоты. Наблюдаются высокие уровни дезамидирования в парах N-G N57, N263, N385 и/или N514 относительно числа SEQ ID NO: 34. Дезамидирование наблюдали в других остатках, как показано в таблице ниже и в примерах. В определенных вариантах осуществления AAVrh79 может иметь другие дезамидированные остатки, например, как правило, менее чем в 10%, и/или может иметь другие модификации, включая метилирование (например, ~R487) (как правило, менее чем 5%, чаще менее чем 1% в заданном остатке), изомеризацию (например, в D97) (как правило, менее чем 5%, чаще менее чем 1% в заданном остатке), фосфорилирование (например, при наличии, в диапазоне от около 10 до

около 60%, или от около 10 до около 30%, или от около 20 до около 60%) (например, в одном или более из S149, ~S153, ~S474, ~T570, ~S665) или окисление (например, в одном или более из W248, W307, W307, M405, M437, M473, W480, W480, W505, M526, M544, M561, W621, M637 и/или W697). Необязательно, W может окисляться до кинуренина.

| ТАБЛИЦА С | |
|--|--|
| Дезамидирование AAVrh79 на основании нумерации VP1 | % дезамидирования |
| N57+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| N94+дезамидирование | 5-15, около 10 |
| ~N254+дезамидирование | 10-20 |
| ~N263+дезамидирование | 75-100 |
| ~N305+дезамидирование | 1-5 |
| ~N385+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| ~N410+дезамидирование | 1-25, |
| N479+дезамидирование | 1-5, 1-3 |
| ~N514+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| ~Q601+дезамидирование | 0-1 |
| N653+дезамидирование | 0-2 |

В определенных вариантах осуществления капсид AAVrh79 модифицирован в одной или более позициях, определенных в предшествующей таблице, в диапазонах, приведенных ниже, по определению методом масс-спектрометрии ферментом трипсином. В определенных вариантах осуществления одна или более из следующих позиций или глицин после N модифицированы, как описано в данном документе. Номера остатков основаны на последовательности AAVrh79, приведенной в данном документе. Смотрите SEQ ID NO: 34.

В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок vp1 капсида AAVrh79, приведена в SEQ ID NO: 33. В других вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты с от 70% до 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 33 может быть выбрана для экспрессии белков капсида AAVrh79. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты является по меньшей мере на около 75% идентичной, по меньшей мере на 80% идентичной, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% идентичной, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 99,9% идентичной SEQ ID NO: 33. При этом другие последовательности нуклеиновых

кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, могут быть выбраны для применения в получении капсидов гAAV. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 33 или последовательность, по меньшей мере на от 70% до 99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную с SEQ ID NO: 33, которая кодирует SEQ ID NO: 34. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 33 или последовательность, на по меньшей мере от 70% до 99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную нуклеотидам от около 412 до около 2214 из SEQ ID NO: 33, которая кодирует белок капсида vp2 (приблизительно ак от 138 до 738) с SEQ ID NO: 34. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты от около нуклеотида 610 до около нуклеотида 2214 из SEQ ID NO: 33 или последовательность, на по меньшей мере от 70% до 99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную с нуклеотидами SEQ ID NO: 33, которая кодирует белок капсида vp3 (приблизительно ак от 204 до 738) с SEQ ID NO: 34.

Изобретение также охватывает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие мутантный AAVrh79, в которых один или более остатков были изменены с целью снижения дезамидирования или присутствуют другие модификации, определенные в данном документе. Такие последовательности нуклеиновых кислот можно использовать для получения мутантных капсидов гAAVrh79.

В определенных вариантах осуществления капсид гAAV включает капсид AAVrh.90, описанный в WO 2020/223232, опубликованной 5 ноября 2019 г., которая включена в данный документ посредством ссылки. В дополнительном аспекте предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV), который содержит: (A) капсид AAVrh.90, содержащий одно или более из: (1) белков капсида AAVrh.90, содержащих: гетерогенную популяцию белков vp1 AAVrh.90, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 738 SEQ ID NO: 40, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 39, или белков vp1, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 39, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 738 SEQ ID NO: 40, гетерогенную популяцию белков vp2 AAVrh.90, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность из по меньшей мере аминокислот

приблизительно от 138 до 738 SEQ ID NO: 40, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 412 до 2214 SEQ ID NO: 39, или белков vp2, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2214 SEQ ID NO: 39, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность из по меньшей мере аминокислот от 138 до 738 SEQ ID NO: 40, гетерогенную популяцию белков vp3 AAVrh.90, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность из по меньшей мере аминокислот приблизительно от 204 до 738 SEQ ID NO: 40, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 610 до 2214 SEQ ID NO: 39, или белков vp3, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 610 до 2214 SEQ ID NO: 39, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность из по меньшей мере аминокислот от 204 до 738 SEQ ID NO: 40; и/или (2) гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно аминокислот от 138 до 738 SEQ ID NO: 40, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 204 до 738 SEQ ID NO: 40, при этом: белки vp1, vp2 и vp3 содержат популяцию с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два аспарагина (N) с высокой степенью дезамидирования в парах аспарагин - глицин в SEQ ID NO: 40, и необязательно дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к изменению аминокислоты; и (B) векторный геном в капсиде AAVrh.90, при этом векторный геном содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV и отличную от AAV последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую продукт, функционально связанную с последовательностями, которые управляют экспрессией продукта в клетке-хозяине.

В определенных вариантах осуществления белки vp1, vp2 и vp3 AAVrh.90 содержат популяцию с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два аспарагина (N) с высокой степенью дезамидирования в парах аспарагин - глицин в SEQ ID NO: 40, и необязательно дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к изменению аминокислоты. Наблюдаются высокие уровни дезамидирования в парах N-G N57, ~N263, ~N385 и/или ~N514 относительно числа SEQ ID NO: 40. Дезамидирование наблюдали в других остатках, как показано в таблице ниже. В определенных вариантах

осуществления AAVrh.90 может иметь другие дезамидированные остатки (например, ~N305, ~N499 и/или ~N599, как правило, в менее чем 20%) и/или могут иметь другие модификации, включая фосфорилирование (например, при наличии, в диапазоне от около 2 до около 30%, или от около 2 до около 20%, или от около 2 до около 10%) (например, в S149) или окисление (например, в одном или более из ~W23, ~M204, ~M212, W248, W282, M405, M473, W480, W505, M526, ~N544, M561 и/или ~M607). Необязательно, W может окисляться до кинуренина.

| ТАБЛИЦА D | |
|---|--|
| Дезамидирование AAVrh.90 на основании нумерации VP1 | % дезамидирования |
| N57+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| N94+дезамидирование | 2-15 или 2-5 |
| ~N263+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| ~N305+дезамидирование | 5-30, 5-20 или 10-20 |
| ~N385+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| ~N499+дезамидирование | 2-15, 2-10 или 5-10 |
| ~N514+дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| ~N599+дезамидирование | 2-15, 2-10 или 5-10 |

В определенных вариантах осуществления капсид AAVrh.90 модифицирован в одной или более позициях, определенных в предшествующей таблице, в приведенных диапазонах по определению методом масс-спектрометрии ферментом трипсином. В определенных вариантах осуществления одна или более из позиций или глицин после N модифицированы, как описано в данном документе. Номера остатков основаны на последовательности AAVrh.90, приведенной в данном документе. Смотрите SEQ ID NO: 40.

В определенных вариантах осуществления капсид AAVrh.90 содержит: гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно аминокислот от 138 до 738 SEQ ID NO: 40, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 204 до 738 SEQ ID NO: 40.

В определенных вариантах осуществления выбирают капсиды парвовирусного вектора для тропизма к печени, а пациент, проходящий лечение, имеет метаболическое нарушение со стороны печени. В определенных вариантах осуществления выбирают капсиды парвовирусного вектора для тропизма к сердцу, а пациент, проходящий лечение, имеет нарушение со стороны сердца. В определенных вариантах осуществления

выбирают капсиды парвовирусного вектора для тропизма в отношении клеток в скелетных мышцах, а пациент, проходящий лечение, имеет нарушение со стороны мышц.

В контексте данного документа «векторный геном» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, упакованной внутри капсида гAAV с образованием вирусной частицы. Такая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательности инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV. В примерах в данном документе векторный геном содержит, как минимум, от 5' к 3', 5' ИКП AAV, экспрессионную кассету, содержащую трансген или кодирующие последовательности, функционально связанные с регуляторными последовательностями, управляющими их экспрессией, и 3' ИКП AAV. ИКП представляют собой генетические элементы, которые отвечают за репликацию и упаковку генома во время получения вектора и являются единственными вирусными цис-элементами, необходимыми для создания гAAV. В одном варианте осуществления ИКП получены из AAV, отличного от обеспечивающего капсид. В предпочтительном варианте осуществления последовательности ИКП получены из AAV2 или его версии с удалением (ДИКП), которую можно использовать для удобства. При этом можно выбрать ИКП из других источников AAV. Когда источником ИКП является AAV2, а капсид AAV получен из другого источника, получаемый в результате вектор можно называть псевдотипированным. Как правило, векторный геном AAV содержит 5' ИКП AAV, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие генный(е) продукт(ы), и любые регуляторные последовательности и 3' ИКП AAV. При этом могут подходить и другие конфигурации этих элементов. В одном варианте осуществления предложен самокомплементарный AAV. Была описана укороченная версия 5' ИКП, называемая ДИКП, в которой удалены D-последовательность и концевой сайт разрешения (trs). В определенных вариантах осуществления векторный геном содержит укороченный ИКП AAV2 из 130 пар оснований, в котором удален внешний элемент «а». Укороченный ИКП превращается обратно в дикий тип длиной 145 пар оснований во время амплификации векторной ДНК с использованием концевого A-элемента в качестве матрицы. В других вариантах осуществления использую полноразмерные 5' и 3' ИКП AAV. В других вариантах осуществления можно выбрать полноразмерный или сконструированный ИКП. Можно выбрать ИКП из AAV2, отличного от капсида источника AAV или отличающиеся от полноразмерных ИКП. ИКП получают из того же источника AAV, что и AAV, который обеспечивает функцию гер во время получения, или транскомплементарный AAV. Кроме того, можно использовать другие ИКП. Примеры подходящих последовательностей ИКП приведены в перечне последовательностей, например, SEQ ID NO: 42, нуклеотиды от 1 до 130 и от 3052 до 3181. Кроме того, векторный геном содержит регуляторные последовательности, которые управляют и модулируют экспрессию генных продуктов (например, прямо или косвенно модулируя транскрипцию и/или трансляцию). Подходящие компоненты векторного генома более подробно обсуждены в данном документе.

В определенных вариантах осуществления векторный геном для редактирования генов содержит промотор TBG, один или более энхансеров альфа *mic/bik*, кодирующую последовательность для мегануклеазы ARCUS, необязательно WPRE и полиА. В определенных вариантах осуществления экспрессионная кассета содержит нуклеотиды от 211 до 2964 из 2964 SEQ ID NO: 42, фланкируемые 5' и 3' ИКП.

Для применения в получении AAV-вирусного вектора (например, рекомбинантного (r) AAV), экспрессионные кассеты могут нести любой подходящий вектор, например, плазмиду, который доставляется в пакующую клетку-хозяина. Плазмиды, применимые в данном изобретении, можно конструировать так, чтобы они подходили для репликации и упаковки *in vitro* в прокариотических клетках, клетках насекомых, клетках млекопитающих, помимо прочего. Подходящие методики трансфекции и пакующие клетки-хозяева известны и/или могут быть легко разработаны специалистом в данной области техники.

Способы создания и выделения AAV, подходящих для применения в качестве векторов, известны в данной области техники. В общем случае, смотрите Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning *et al.*, 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med.* 10:717-733; и цитируемые ниже ссылки, каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Для упаковки трансгена в вирионы ИКП являются единственными компонентами AAV, необходимыми *in cis*, в той же конструкции, что и молекула нуклеиновой кислоты, содержащая экспрессионные кассеты. Гены *cap* и *rep* могут находиться в *trans*.

Термин «промежуточный AAV» или «промежуточный AAV-вектор» относится к собранному капсиду гAAV, в котором отсутствуют упакованные необходимые геномные последовательности. Он также может называться «пустым капсидом». Такой капсид может не содержать выявляемых геномных последовательностей экспрессионной кассеты или содержать только частично упакованные геномные последовательности, которых недостаточно для обеспечения экспрессии генного продукта. Эти пустые капсиды являются нефункциональными в отношении переноса представляющего интерес гена в клетку-хозяина.

Описанный в данном документе рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV) можно создавать, используя известные методики. Смотрите, например, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Такой способ включает культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок капсида AAV; функциональный ген *rep*; экспрессионную кассету, состоящую, как минимум, из инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV и трансгена; и достаточные вспомогательные функции для обеспечения упаковки экспрессионной кассеты в белок капсида AAV. Были описаны способы создания капсида, кодирующих последовательностей для него и способы получения гAAV-вирусных

векторов. Смотрите, например, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) и US 2013/0045186A1.

В одном варианте осуществления предложена вырабатывающая клеточная культура для получения рекомбинантного AAV. Такая клеточная культура содержит нуклеиновую кислоту, которая экспрессирует белок капсида AAV в клетке-хозяине; молекулу нуклеиновой кислоты, подходящую для упаковки в капсид AAV, например, векторный геном, который содержит ИКП AAV, или отличную от AAV последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую генный продукт, функционально связанную с последовательностями, которые управляют экспрессией продукта в клетке-хозяине; и достаточные функции гер AAV и аденовирусные вспомогательные функции для обеспечения упаковки молекулы нуклеиновой кислоты в рекомбинантный капсид AAV. В одном варианте осуществления клеточная культура состоит из клеток млекопитающих (например, клеток почки эмбриона человека 293, помимо прочего) или клеток насекомых (например, бакуловирус).

Необязательно, функции гер обеспечены AAV, отличным от AAV, обеспечивающего капсид. Например, гер может представлять собой, но не ограничивается этим, белок гер AAV1, белок гер AAV2, белок гер AAV3, белок гер AAV4, белок гер AAV5, белок гер AAV6, белок гер AAV7, белок гер AAV8; или гер 78, гер 68, гер 52, гер 40, гер68/78 и гер40/52; или их фрагмент; или другой источник. Необязательно, последовательности гер и сар находятся в одном генетическом элементе в клеточной культуре. Между последовательностью гер и геном сар может находиться спейсер. Любая из последовательностей капсида этих AAV или мутантных AAV может находиться под управлением экзогенных регуляторных контрольных последовательностей, которые управляют их экспрессией в клетке-хозяине.

В одном варианте осуществления клетки получают в подходящей клеточной культуре (например, клетки НЕК 293). Способы получения векторов для генной терапии, описанные в данном документе, включают способы, хорошо известные в данной области техники, например, создание плазмидной ДНК, используемой для получения векторов для генной терапии, создание векторов и очистка векторов. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой AAV-вектор, а получаемые плазмиды представляют собой цис-плазмиду AAV, кодирующую геном AAV и представляющий интерес ген, транс-плазмиду AAV, содержащую гены гер и сар, и аденовирусную вспомогательную плазмиду. Процесс создания вектора может включать рабочие этапы, такие как инициация клеточной культуры, пассирование клеток, посев клеток, трансфекция клеток плазмидной ДНК, замена среды после трансфекции на бессывороточную среду и сбор содержащих вектор клеток и культуральной среды. Сбор содержащих вектор клеток и культуральной среды называются в данном документе сбором неочищенных клеток. В другой системе векторы для генной терапии вносят в клетки насекомых путем инфицирования векторами на основе бакуловируса. Обзор этих вырабатывающих систем в общем случае смотрите в Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adeno-

associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production,” *Human Gene Therapy* 20:922-929, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Способы создания и применения этих и других вырабатываемых систем на основе AAV также описаны в следующих патентах США, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки: 5139941; 5741683; 6057152; 6204059; 6268213; 6491907; 6660514; 6951753; 7094604; 7172893; 7201898; 7229823; и 7439065.

После этого сбор неочищенных клеток можно подвергать рабочим этапам, таким как концентрирование собранного вектора, диафильтрация собранного вектора, микрофлюидизация собранного вектора, расщепление собранного вектора нуклеазами, фильтрация микрофлюидизированного промежуточного продукта, очистка неочищенного продукта посредством хроматографии, очистка неочищенного продукта посредством ультрацентрифугирования, замена буфера посредством тангенциальной поточной фильтрации и/или составление и фильтрация для получения общей массы вектора.

Для очистки векторного лекарственного продукта и для удаления пустых капсидов используют очистку посредством двухэтапной аффинной хроматографии при высокой концентрации соли с последующей хроматографией на анионообменной смоле. Эти способы более подробно описаны в публикации международного патента № WO 2017/160360, которая включена в данный документ посредством ссылки. Способы очистки для AAV8, публикация международного патента № WO 2017/100676, и rh10, публикация международного патента № WO 2017/100704, и для AAV1, публикация международного патента № WO 2017/100674, все включены в данный документ посредством ссылки.

Для расчета содержания пустых и полных частиц строят график зависимости объемов полосы VP3 для выбранного образца (например, в примерах данного документа, очищенного в градиенте йодиксанола препарата, где кол-во ГК=кол-ву частиц) от количества загруженных ГК частиц. Полученное линейное уравнение ($y=mx+c$) используют для расчета числа частиц в объемах полос пиков исследуемого препарата. Затем число частиц (чт) на 20 мкл загрузки умножают на 50 с получением кол-ва частиц (чт)/мл. Деление чт/мл на ГК/мл дает соотношение кол-ва частиц к кол-ву геномных копий (чт/ГК). Чт/мл - ГК/мл дает кол-во пустых чт/мл. Деление кол-ва пустых чт/мл на чт/мл и $\times 100$ дает процент пустых частиц.

В общем случае, способы анализа пустых капсидов и частиц AAV-вектора с упакованными геномами известны в данной области техники. Смотрите, например, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. Способы для исследования денатурированных капсидов включают проведение для обработанного исходного раствора AAV электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле, состоящем из любого геля, способного разделить три капсидных белка, например, градиента геля, содержащего 3-8% Трис-ацетат в буфере, затем проведение геля до разделения материала образца и блоттинг геля на нейлоновых или нитроцеллюлозных

мембранах, предпочтительно нейлоновых. Затем используют антитела к капсиду AAV в качестве первичных антител, которые связываются с денатурированными капсидными белками, предпочтительно моноклональное антитело к капсиду AAV, наиболее предпочтительно моноклональное антитело к AAV-2 B1 (Wobus et al., *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). Затем используют вторичное антитело, которое связывается с первичным антителом и содержит средства для выявления связывания с первичным антителом, более предпочтительно антитело к IgG, содержащее выявляющую молекулу, ковалентно связанную с ним, наиболее предпочтительно овечье антитело к мышиному IgG, ковалентно связанное с пероксидазой хрена. Способ выявления связывания используют для полуколичественного определения связывания между первичным и вторичным антителами, предпочтительно способ выявления, способный выявлять эмиссию радиоактивных изотопов, электромагнитное излучение или колориметрические изменения, наиболее предпочтительно набор для выявления хемилюминесценции. Например, для ДСН-ПААГ, можно извлекать образцы из колоночных фракций и нагревать в загрузочном буфере ДСН-ПААГ, содержащем восстанавливающий агент (например, ДТТ), и проводить разрешение капсидных белков на готовых градиентных полиакриламидных гелях (например, Novex). Окрашивание серебром можно проводить, используя SilverXpress (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя, или другой подходящий способ окрашивания, т. е. красителями SYPRO рубиновым или кумасси. В одном варианте осуществления концентрацию векторных геномов (вг) AAV в колоночных фракциях можно измерять посредством количественной ПЦР в реальном времени (К-ПЦР). Образцы разводят и расщепляют ДНКазой I (или другой подходящей нуклеазой) для удаления экзогенной ДНК. После инактивации нуклеазы образцы дополнительно разводят и амплифицируют, используя праймеры и флуорогенный зонд TaqMan™, специфический в отношении последовательности ДНК между праймерами. Число циклов, необходимое для достижения определенного уровня флуоресценции (пороговый цикл, Ct) измеряют для каждого образца на системе для выявления последовательностей Applied Biosystems Prism 7700. Плазмидную ДНК, содержащую последовательности, идентичные содержащимся в AAV-векторе, используют для создания стандартной кривой в реакции К-ПЦР. Значения порогового цикла (Ct), полученные из образцов, используют для определения титра векторного генома путем нормализации его к значению Ct плазмидной стандартной кривой. Также можно использовать анализ конечных точек на основании цифровой ПЦР.

В одном аспекте используют оптимизированный метод кПЦР, в котором используется сериновая протеаза широкого спектра действия, например протеиназа К (например, коммерчески доступная от Qiagen). Конкретнее, оптимизированный кПЦР-анализ геномного титра аналогичен стандартному анализу за исключением того, что после расщепления ДНКазой I образцы разводят буфером с протеиназой К и обрабатывают протеиназой К с последующей термоинактивацией. Предпочтительно образцы разводят буфером с протеиназой К в количестве, равном объему образца. Буфер с протеиназой К

можно концентрировать в 2 раза и более. Как правило, обработка протеиназой К составляет около 0,2 мг/мл, но может варьироваться от 0,1 мг/мл до около 1 мг/мл. Этап обработки в общем случае проводят при около 55°C в течение около 15 минут, но могут проводить при более низкой температуре (например, от около 37°C до около 50 °C) в течение большего периода времени (например, от около 20 минут до около 30 минут) или более высокой температуре (например, до около 60 °C) в течение меньшего периода времени (например, от около 5 до 10 минут). Аналогично, термоинактивацию проводят в общем случае при около 95°C в течение около 15 минут, но температуру можно уменьшать (например, от около 70 до около 90 °C), а время увеличивать (например, от около 20 минут до около 30 минут). Затем образцы разводят (например, в 1000 раз) и подвергают анализу TaqMan, как описано для стандартного анализа.

В дополнительном или альтернативном варианте можно использовать цифровую капельную ПЦР (цкПЦР). Например, были описаны способы определения титров одноцепочечного и самокомплементарного AAV-векторного генома посредством цкПЦР. Смотрите, например, M. Lock et al, *Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14. Метод цкПЦР позволяет напрямую измерять концентрацию инкапсидированных векторных геномов. Образец обрабатывают ДНКазой I для расщепления какой-либо неинкапсидированной ДНК, присутствующей в образце, с последующей обработкой протеиназой К для разрушения капсида. Затем образец разводят для соответствия аналитическому диапазону. Образец смешивают с супермиксом для цкПЦР и проводят выявление, используя специфические в отношении последовательности праймеры, нацеленные на мегануклеазу, специфическую в отношении гена *PCSK9* (*M2PCSK9*), в комбинации с флуоресцентно-меченным зондом, гибридизирующимся к той же самой области. Двадцать микролитров реакционной смеси цкПЦР обрабатывают в капельном генераторе Bio-Rad и разделяют реакционную смесь цкПЦР на ≥ 10000 капель. После создания капель проводят амплификацию реакционной смеси цкПЦР и считывание амплифицированной реакционной смеси цкПЦР с использованием капельного ридера Bio-Rad.

Можно использовать анализ инфекционных единиц (ИЕ) для определения продуктивного поглощения и репликации гAAV-вектора в клетках RC32 (rep2-экспрессирующие клетки HeLa). 96-луночный формат с конечными точками использовали аналогично описанному ранее способу. Вкратце, клетки RC32 коинфицируют серийными разведениями гAAV BDS и одинаковым разведением Ad5 с 12 повторами при каждом разведении гAAV. Через семьдесят два часа после инфицирования клетки лизируют и проводят кПЦР для выявления амплификации гAAV-вектора по сравнению с исходным количеством. Расчет конечного разведения дозы, инфицирующей 50% тканевой культуры ($TCID_{50}$) (по Спирману - Керберу) проводят для определения инфекционного титра, выраженного как ИЕ/мл. Поскольку значения «инфективности» зависят от контакта каждой частицы с клетками, связывания рецептора, интернализации, переноса в ядро и репликации генома, на них влияет геометрия анализа и присутствие соответствующих

рецепторов, а также пути после связывания в используемой линии клеток. Рецепторы и пути после связывания не обязательно сохраняются в иммортализованных линиях клеток и, следовательно, аналитические титры инфективности не являются абсолютным показателем числа присутствующих «инфекционных» частиц. Однако соотношение инкапсидированных ГК и «инфекционных единиц» (называемое соотношением ГК/ИЕ) можно использовать как показатель соответствия продукта между партиями.

Вкратце, способ отделения частиц rAAV, имеющих упакованные геномные последовательности, от промежуточных AAV с дефицитом генома включает подвержение суспензии, содержащей рекомбинантные вирусные частицы AAV и промежуточные капсиды AAV, высокоэффективной жидкостной хроматографии, когда вирусные частицы AAV и промежуточные AAV связаны с сильной анионообменной смолой, уравновешенной при высоком pH, и подвергаются воздействию солевого градиента с отслеживанием элюата в отношении ультрафиолетового поглощения на около 260 и около 280. pH можно корректировать в зависимости от выбранного AAV. Смотрите, например, WO2017/160360 (AAV9), WO2017/100704 (AAVrh10), WO 2017/100676 (например, AAV8) и WO 2017/100674 (AAV1)], которые включены в данный документ посредством ссылки. В этом способе полные капсиды AAV собирают из фракции, элюированной, когда соотношение A260/A280 достигает инфекционной точки. В одном примере для этапа аффинной хроматографии диафильтрованный продукт можно наносить на аффинную смолу Capture Select™ Poros- AAV2/9 (Life Technologies), которая эффективно захватывает серотип AAV2. В этих ионных условиях значительный процент остаточной клеточной ДНК и белков протекает через колонку, тогда как частицы AAV оказываются эффективно захваченными.

ДВОЙНАЯ ВЕКТОРНАЯ СИСТЕМА

В другом аспекте предложена двойная векторная система для лечения генетического нарушения. Эта система содержит (а) компонент редактирования генов, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, нацеленную на PCSK9, и, необязательно, регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9; и (б) донорный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный продукт для экспрессии из локуса PCSK9, при этом вставленная последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует PCSK9 и при этом система дополнительно содержит последовательности, которые направляют нуклеазу для специфического нацеливания на локус нативного гена PCSK9. Система дополнительно содержит компонент, который обеспечивает возможность абляции или уменьшения количества нативного PCSK9 в клетке-хозяине после введения дозы двойной векторной системы, например, посредством применения индуцирующего агента с индуцибельным промотором. В одном варианте осуществления компонент редактирования генов содержится в векторе для редактирования генов, содержащем экспрессионную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, и

регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9. Компоненты двойной векторной системы описаны ниже.

Хотя система может быть эффективной, если соотношение компонента редактирования генов и донорного вектора составляет около 1 к около 1, желательно, чтобы донорный матричный вектор присутствовал в избытке в компоненте редактирования генов. В одном варианте осуществления соотношение вектора для редактирования генов (a) и донорного вектора (b) составляет от около 1:3 до около 1:100 или около 1:10. Это соотношение фермента для редактирования генов (например, Cas9 или мегануклеазы) к донорной матрице можно поддерживать даже если фермент, в дополнительном или альтернативном варианте, обеспечен источником, отличным от AAV-вектора.

В одном варианте осуществления двойная векторная система содержит AAV-вектор для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный геном, содержащий 5' ИКП, последовательность, кодирующую мегануклеазу, нацеленную на PCSK9, под управлением регуляторных последовательностей, которые управляют экспрессией мегануклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, и 3' ИКП; и (b) донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, 3' плечо HDR и 3' ИКП.

В другом варианте осуществления двойная векторная система содержит AAV для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный геном, содержащий 5' ИКП, 5' сигнал ядерной локализации (СЯЛ), последовательность, кодирующую Cas9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией SaCas9 в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, 3' СЯЛ и 3' ИКП; и донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, 3' плечо HDR, промотор U6, оРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9, и 3' ИКП.

В другом варианте осуществления двойная векторная система содержит AAV-вектор для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный геном, содержащий 5' ИКП, промотор U6, оРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9, 5' сигнал ядерной локализации (СЯЛ), последовательность, кодирующую Cas9, и регуляторные последовательности,

которые управляют экспрессией Cas9 в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, 3' СЯЛ и 3' ИКП; и донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, 3' плечо HDR и 3' ИКП.

В определенных вариантах осуществления систем, описанных в данном документе, AAV-вектор для редактирования генов и донорный AAV-вектор имеют одинаковый капсид AAV. В других вариантах осуществления AAV-вектор для редактирования генов и донорный AAV-вектор имеют разные капсиды AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV выбран из AAV8, AAV9, rh10, AAV6.2, AAV3B, hu37, rh79 и rh64.

В определенных вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу, и при этом Cas9 выбрана из Cas9 *Staphylococcus aureus* или *Streptococcus pyogenes*.

В определенных вариантах осуществления нуклеаза и/или трансген находятся под управлением тканеспецифического промотора. В определенных вариантах осуществления нуклеаза и/или трансген находятся под управлением конститутивного промотора. В определенных вариантах осуществления нуклеаза и/или трансген находятся под управлением индуцибельного промотора. В определенных вариантах осуществления нуклеаза и/или трансген находятся под управлением печеночно-специфического промотора, необязательно, промотора человеческого тироксин-связывающего глобулина (TBG) или гибридного печеночного промотора (HLP). В определенных вариантах осуществления система дополнительно содержит индуцирующий агент.

В другом варианте осуществления система содержит (а) компонент редактирования генов, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, нацеленную на PCSK9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, инкапсулированный в ЛНЧ; и (b) донорный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный продукт для экспрессии из локуса PCSK9, инкапсулированного в ЛНЧ, при этом вставленная последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует PCSK9 и при этом система дополнительно содержит последовательности, которые направляют нуклеазу для специфического нацеливания на локус нативного гена PCSK9. Система дополнительно содержит компонент, который обеспечивает возможность абляции или уменьшения количества нативного PCSK9 в клетке-хозяине после введения дозы двойной векторной системы, например, посредством применения индуцирующего агента с индуцибельным промотором.

В другом варианте осуществления система содержит (а) компонент редактирования генов, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, нацеленную на PCSK9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, при этом компонент

редактирования генов предоставлен в AAV-векторе; и (b) донорный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный продукт для экспрессии из локуса PCSK9, инкапсулированного в ЛНЧ, при этом вставленная последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует PCSK9 и при этом система дополнительно содержит последовательности, которые направляют нуклеазу для специфического нацеливания на локус нативного гена PCSK9. Система дополнительно содержит компонент, который обеспечивает возможность абляции или уменьшения количества нативного PCSK9 в клетке-хозяине после введения дозы двойной векторной системы, например, посредством применения индуцирующего агента с индуцибельным промотором.

В другом варианте осуществления система содержит (a) компонент редактирования генов, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, нацеленную на PCSK9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, инкапсулированный в ЛНЧ; и (b) донорный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный продукт для экспрессии из локуса PCSK9, при этом донорный вектор представляет собой AAV-вектор, при этом вставленная последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует PCSK9 и при этом система дополнительно содержит последовательности, которые направляют нуклеазу для специфического нацеливания на локус нативного гена PCSK9. Система дополнительно содержит компонент, который обеспечивает возможность абляции или уменьшения количества нативного PCSK9 в клетке-хозяине после введения дозы двойной векторной системы, например, посредством применения индуцирующего агента с индуцибельным промотором.

В одном варианте осуществления двойная векторная система содержит (a) ЛНЧ, содержащую мРНК, которая кодирует мегануклеазу, нацеленную на PCSK9, под управлением регуляторных последовательностей, которые управляют экспрессией мегануклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9; и (b) донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, 3' плечо HDR и 3' ИКП.

В другом варианте осуществления двойная векторная система содержит (a) ЛНЧ, содержащую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую Cas9, и огРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9; и (b) донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, 3' плечо HDR и 3' ИКП. Последовательность,

кодирующая Cas9, предоставлена в виде мРНК.

В другом варианте осуществления двойная векторная система содержит AAV-вектор для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный ген, содержащий 5' ИКП, промотор U6, орРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (РАМ), который специфически распознается Cas9, 5' сигнал ядерной локализации (СЯЛ), последовательность, кодирующую Cas9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией Cas9 в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, 3' СЯЛ и 3' ИКП; и донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный ген, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, 3' плечо HDR и 3' ИКП.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

В другом аспекте предложена фармацевтическая композиция, которая содержит первый исходный раствор гAAV, содержащий гAAV-векторы для редактирования генов, содержащие экспрессионную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, нацеленную на PCSK9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-хозяине, содержащей ген PCSK9; и второй исходный раствор гAAV, содержащий донорные гAAV-векторы, содержащие трансгенную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансген, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-хозяине. Фармацевтическая композиция содержит необязательный носитель, эксципиент и/или консервант. В некоторых вариантах осуществления донорный вектор дополнительно содержит плечи обусловленной гомологией рекомбинации (HDR) 5' и 3' относительно трансгенной кассеты. В одном варианте осуществления капсид AAV для донорного вектора, вектора для редактирования генов или их обоих представляет собой капсид AAVrh79. В другом варианте осуществления капсид AAV для донорного вектора, вектора для редактирования генов или их обоих представляет собой капсид AAVrh.90. В другом варианте осуществления капсид AAV для донорного вектора, вектора для редактирования генов или их обоих представляет собой капсид AAVhu.37. В одном варианте осуществления капсид AAV для донорного вектора, вектора для редактирования генов или их обоих представляет собой капсид AAV8. В одном варианте осуществления капсид AAV для донорного вектора, вектора для редактирования генов или их обоих представляет собой капсид AAVrh.91. В одном варианте осуществления капсид AAV для донорного вектора, вектора для редактирования генов или их обоих представляет собой капсид AAVhu.68.

В контексте данного документа «носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты для придания изотоничности и замедления всасывания,

буферы, несущие растворы, суспензии, коллоиды и т. п. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции. Выражение «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным компонентам и композициям, которые не вызывают аллергической или аналогичной нежелательной реакции при введении хозяину. Средства доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и т. п., можно использовать для внесения композиций по настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяев. В частности, доставляемые с помощью rAAV-вектора векторные геномы можно составлять для доставки в инкапсулированном виде в липидной частице, липосоме, везикуле, наносфере или наночастице и т. д.

В одном варианте осуществления композиция содержит конечный состав, подходящий для доставки субъекту, например, представляющий собой водную жидкую суспензию, забуференную до физиологически совместимых pH и концентрации соли. Необязательно, в составе присутствуют одно или более поверхностно-активных веществ. В другом варианте осуществления композицию можно транспортировать в виде концентрата, который разводят для введения субъекту. В других вариантах осуществления композицию можно лиофилизировать и восстанавливать во время введения.

Способы и агенты, хорошо известные в области получения составов, описаны, например, в “Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Company, Easton, Pa. Составы могут, например, содержать эксципиенты, носители, стабилизаторы или разбавители, такие как стерильная вода, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрогенизированные нафталены, консерванты (такие как октадецилдиметилбензил, хлорид аммония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фено, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и m-крезол), низкомолекулярные полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин и лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу и декстрины, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как ТВИН™, ПЛЮРОНИК™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулах, полученных, например, методами коацервации или путем межфазной полимеризации, например, микрокапсулах из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулах из поли(метилметакрилата), соответственно, в коллоидных системах доставки

лекарственного препарата (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Подходящее поверхностно-активное вещество или комбинацию поверхностно-активных веществ можно выбрать из неионных поверхностно-активных веществ, которые являются нетоксичными. В одном варианте осуществления выбрано дифункциональное поверхностно-активное вещество на основе блок-сополимера, заканчивающееся первичными гидроксильными группами, например, такое как Плуороник® F68 [BASF], также известный как Полоксамер 188, который имеет нейтральный pH и среднюю молекулярную массу 8400. Можно выбирать другие поверхностно-активные вещества и другие полоксамеры, т. е. неионные триблок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли(пропиленоксида)), окруженной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксида)), СОЛЮТОЛ HS 15 (макрогол-15 гидроксистеарат), ЛАБРАЗОЛ (полиоксикаприловый глицерид), полиокси-10-олеиловый эфир, ТВИН (комплекс полиоксиэтиленсорбита и сложного эфира жирной кислоты), этанол и полиэтиленгликоль. В одном варианте осуществления состав содержит полоксамер. Эти сополимеры обычно обозначают буквой «Р» (в случае полоксамера), за которой следуют три цифры: первые две цифры $\times 100$ дают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового ядра, а последняя цифра $\times 10$ дает процент содержания полиоксиэтилена. В одном варианте осуществления выбран полоксамер 188. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в количестве от около 0,0005% до около 0,001% от суспензии.

Векторы вводят в достаточных количествах для трансфекции клеток и обеспечения достаточных уровней переноса генов и экспрессии, чтобы обеспечить терапевтическую пользу без нежелательных явлений или с медицински приемлемыми физиологическими эффектами, которые могут определить специалисты в области медицины. Традиционные и фармацевтически приемлемые пути введения включают, но не ограничиваются этим, прямую доставку в необходимый орган (например, печень (необязательно, через печеночную артерию), легкое, сердце, глаз, почку), пероральный, ингаляционный, интраназальный, интратекальный, внутриартериальный, внутриглазной, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный и другие парентеральные пути введения. При необходимости пути введения можно комбинировать.

Дозировки вирусного вектора зависят, главным образом, от таких факторов, как подлежащее лечению патологическое состояние, возраст, масса и состояние здоровья пациента, и могут варьироваться среди пациентов. Например, терапевтически эффективная дозировка вирусного вектора для человека в общем случае находится в диапазоне от около 25 до около 1000 микролитров в около 100 мл растворе, содержащем концентрации от около 1×10^9 до 1×10^{16} геномов вирусного вектора. Дозировку корректируют, чтобы сбалансировать терапевтическую пользу и любые побочные эффекты, при этом такие дозировки могут варьироваться в зависимости от

терапевтического применения, для которого используют рекомбинантный вектор. Можно отслеживать уровни экспрессии продукта трансгена, чтобы определить частоту введения доз, приводящую к получению вирусных векторов, предпочтительно AAV-векторов, содержащих миниген. Необязательно, схемы введения доз, аналогичные описанным для терапевтических целей, можно применять для иммунизации с использованием композиций по изобретению.

Векторные композиции можно составлять в единичных дозировках, содержащих количество дефективного по репликации вируса, которое находится в диапазоне от около $1,0 \times 10^9$ ГК до около $1,0 \times 10^{16}$ ГК (для лечения субъекта со средней массой тела 70 кг), включая все целые или дробные количества в пределах диапазона, и предпочтительно от $1,0 \times 10^{12}$ ГК до $1,0 \times 10^{14}$ ГК для пациента-человека. В одном варианте осуществления композиции составлены так, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 или 9×10^9 ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте осуществления композиции составлены так, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} или 9×10^{10} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте осуществления композиции составлены так, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} или 9×10^{11} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте осуществления композиции составлены так, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} или 9×10^{12} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте осуществления композиции составлены так, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} или 9×10^{13} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте осуществления композиции составлены так, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} или 9×10^{14} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте осуществления композиции составлены так, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} или 9×10^{15} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В одном варианте осуществления для применения человеком доза может находиться в диапазоне от 1×10^{10} до около 1×10^{12} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона.

Эти вышеприведенные дозы можно вводить в различных объемах носителя, эксципиента или буферного состава, в диапазоне от около 25 до около 1000 микролитров или в больших объемах, включая все числа в пределах диапазона, в зависимости от размера подлежащего лечению участка, используемого вирусного титра, пути введения и необходимого эффекта от способа.

Можно выбирать любой подходящий путь введения. Соответственно, фармацевтические композиции можно составлять для любого подходящего пути

введения, например, в форме жидких растворов или суспензий (как, например, в случае внутривенного введения, в случае перорального введения и т. д.). В альтернативном варианте фармацевтические композиции могут находиться в твердой форме (например, в форме таблеток или капсул, например, в случае перорального введения). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут находиться в форме порошков, капель, аэрозолей и т. д.

В одном аспекте в данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере парвовирусный вектор, содержащий по меньшей мере один вектор для редактирования генов и по меньшей мере один донорный вектор, описанные в данном документе, в буфере для составления. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит комбинацию разных векторных популяций. В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая одну популяцию гAAV, описанную в данном документе, в буфере для составления. Предложенные в данном документе способы обеспечивают возможность совместного введения двух отдельных содержащих векторы суспензий.

СПОСОБЫ

Предложенные в данном документе композиции применимы для лечения различных генетических нарушений, включая метаболические нарушения со стороны печени. В определенных вариантах осуществления композиции применимы в лечении дефицита орнитинтранскарбамилазы. В других вариантах осуществления композиции применимы в лечении семейной гиперхолестеринемии. В других вариантах осуществления композиции применимы в лечении фенилкетонурии.

Типовые заболевания или нарушения со стороны печени, которые можно лечить, включают, но не ограничиваются этим, гепатит А, гепатит В, гепатит С, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный холангит, первичный склерозирующий холангит, гемохроматоз, болезнь Вильсона, дефицит альфа-1-антитрипсина, рак печени, рак желчного протока, аденому печени, заболевания или расстройства, связанные с транстиретином (TTR), пропротеинконвертазой субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), или любую их комбинацию. Дополнительные нарушения включают болезнь накопления гликогена или дефицит гликогена типа 1А (GSD1), дефицит PEPCK, дефицит CDKL5, галактоземия, фенилкетонурию (PKU), первичную гипероксалурию типа 1, болезнь кленового сиропа, тирозинемия типа 1, метилмалоновую ацидемию, дефицит среднепочечного ацетил-СоА, дефицит орнитин-транскарбамилазы, цитруллинемию; дефицит лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (LCAT), аметилмалоновую ацидемию (ММА), болезнь Ниманна - Пика, пропионовую ацидемию (РА); семейную гиперхолестеринемия (FH), деменцию, дефицит липопротеинлипазы, болезнь Криглера - Найяра, тяжелый комбинированный иммунодефицит, подагру и синдром Леша - Найхана, дефицит биотинидазы, болезнь Фабри, ганглиозидоз GM1, болезнь Вильсона, болезнь Гоше типа 2 и 3, синдром Цельвегера, метахроматическую лейкоцистинофию, болезнь Краббе, болезнь Помпе, болезнь Ниманна - Пика типа А, аргининосукцинурию,

цитруллинемию с началом во взрослом возрасте типа II, нарушения цикла мочевины; липогранулематоз Фарбера, аспартилглюкозаминурию, фукозидоз, альфа-маннозидоз, острую перемежающуюся порфирию (AIP), дефицит альфа-1-антитрипсина (эмфизему), анемию вследствие талассемии или почечной недостаточности, ишемические заболевания, закупоренные кровеносные сосуды, наблюдаемые, например, при атеросклерозе, тромбозе или эмболизме, болезнь Паркинсона, врожденный порок сердца, мышечные дистрофии и сахарный диабет.

В определенных описанных в данном документе способах нативная экспрессия PCSK9 снижена или аблирована, а трансген экспрессируется вследствие вставки в нативный локус PCSK9. В другом варианте осуществления нативная экспрессия PCSK9 снижена или аблирована, а трансген экспрессируется экзогенно, т. е. без интеграции в геном субъекта.

В данном документе предложен способ лечения нарушения у человека путем совместного введения двойной векторной системы, описанной в данном документе.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения метаболического нарушения со стороны печени у субъекта. Этот способ включает совместное введение субъекту, имеющему метаболическое нарушение со стороны печени, AAV-вектора для генного редактирования, содержащего последовательность, кодирующую нуклеазу, нацеленную на PCSK9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9; и донорного AAV-вектора, содержащего трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени. В другом варианте осуществления способ включает совместное введение субъекту, имеющему метаболическое нарушение со стороны печени, ЛНЧ, содержащей последовательность, кодирующую нуклеазу Cas9 и оgРНК, нацеленные на PCSK9 в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9; и донорного AAV-вектора, содержащего трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени. В одном варианте осуществления субъект представляет собой новорожденного.

В определенных вариантах осуществления AAV-вектор для генного редактирования и донорный вектор доставляют практически одновременно и одним путем. В других вариантах осуществления сначала доставляют вектор для редактирования генов. В других вариантах осуществления сначала доставляют донорный вектор.

В одном варианте осуществления дозировка гAAV составляет от около 1×10^9 ГК до около 1×10^{15} геномных копий (ГК) на дозу (для лечения субъекта со средней массой тела 70 кг) и предпочтительно от $1,0 \times 10^{12}$ ГК до $2,0 \times 10^{15}$ ГК для пациента-человека. В другом варианте осуществления доза составляет менее чем около 1×10^{14} ГК/кг массы тела субъекта. В определенных вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет по меньшей мере около $1,0 \times 10^9$ ГК/кг, около $1,5 \times 10^9$ ГК/кг, около $2,0 \times 10^9$ ГК/кг, около $2,5 \times 10^9$ ГК/кг, около $3,0 \times 10^9$ ГК/кг, около $3,5 \times 10^9$ ГК/кг, около $4,0 \times 10^9$ ГК/кг, около $4,5 \times 10^9$ ГК/кг, около $5,0 \times 10^9$ ГК/кг, около $5,5 \times 10^9$ ГК/кг, около $6,0 \times 10^9$ ГК/кг, около

$6,5 \times 10^9$ ГК/кг, около $7,0 \times 10^9$ ГК/кг, около $7,5 \times 10^9$ ГК/кг, около $8,0 \times 10^9$ ГК/кг, около $8,5 \times 10^9$ ГК/кг, около $9,0 \times 10^9$ ГК/кг, около $9,5 \times 10^9$ ГК/кг, около $1,0 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $1,5 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $2,0 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $2,5 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $3,0 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $3,5 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $4,0 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $4,5 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $5,0 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $5,5 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $6,0 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $6,5 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $7,0 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $7,5 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $8,0 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $8,5 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $9,0 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $9,5 \times 10^{10}$ ГК/кг, около $1,0 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $1,5 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $2,0 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $2,5 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $3,0 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $3,5 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $4,0 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $4,5 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $5,0 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $5,5 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $6,0 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $6,5 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $7,0 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $7,5 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $8,0 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $8,5 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $9,0 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $9,5 \times 10^{11}$ ГК/кг, около $1,0 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $1,5 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $2,0 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $2,5 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $3,0 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $3,5 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $4,0 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $4,5 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $5,0 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $5,5 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $6,0 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $6,5 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $7,0 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $7,5 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $8,0 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $8,5 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $9,0 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $9,5 \times 10^{12}$ ГК/кг, около $1,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $1,5 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $2,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $2,5 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $3,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $3,5 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $4,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $4,5 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $5,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $5,5 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $6,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $6,5 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $7,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $7,5 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $8,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $8,5 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $9,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, около $9,5 \times 10^{13}$ ГК/кг или около $1,0 \times 10^{14}$ ГК/кг массы тела субъекта.

Другими примерами подходящих заболеваний, которые можно лечить, используя описанные в данном документе композиции, являются семейная гиперхолестеринемия, мышечная дистрофия, муковисцидоз и редкие или орфанные заболевания. Примеры таких редких заболеваний могут включать, помимо прочего, спинальную мышечную атрофию, болезнь Хантингтона, синдром Ретта, боковой амиотрофический склероз (БАС), мышечную дистрофию Дюшена, атаксию Фридрихса, спиноцеребеллярную атаксию типа 2 (СЦА2)/БАС, програнулин (PRGN) (связанный с отличной от болезни Альцгеймера дегенерацией головного мозга, включая лобно-височную деменцию (ЛВД), прогрессирующую небеглую афазию (ПНБА) и семантическую деменцию). Смотрите, например, www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php; rarediseases.info.nih.gov/diseases. Другие заболевания, связанные с трансгенами, описанными в данном документе, также можно лечить, используя способы, описанные в данном документе.

Векторы вводят в достаточных количествах для трансфекции клеток и обеспечения достаточных уровней переноса генов и экспрессии, чтобы обеспечить терапевтическую пользу без нежелательных явлений или с медицински приемлемыми физиологическими эффектами, которые могут определить специалисты в области медицины. Желательные пути введения включают прямую доставку в необходимый орган (например, печень (необязательно, через печеночную артерию), легкое, сердце, глаз, почку), пероральный,

ингаляционный, интраназальный, интратекальный, внутриартериальный, внутриглазной, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный и другие парентеральные пути введения. При необходимости пути введения можно комбинировать.

Описанная в данном документе система может быть терапевтически применимой, если создается достаточное количество функционального фермента или белка для улучшения состояния пациента. В определенных вариантах осуществления уровни генной экспрессии уже в 5% от уровня здоровых пациентов обеспечат достаточный терапевтический эффект для пациента, чтобы его можно было лечить отличными от генной терапии подходами. В других вариантах осуществления уровни генной экспрессии составляют по меньшей мере около 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, вплоть до 100% от нормального диапазона (уровней), наблюдаемого у человека (или другого ветеринарного субъекта). Например, под «функциональным ферментом» подразумевается ген, который кодирует фермент дикого типа (например, ОТСазу), который обеспечивает по меньшей мере около 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или приблизительно столько же, или больше чем 100% от уровня биологической активности фермента дикого типа, или его природного варианта или полиморфа, который не связан с заболеванием. Конкретнее, поскольку гетерозиготные пациенты могут иметь функциональный уровень фермента около 50% или ниже, для эффективного лечения может не требоваться замещение ферментной активности до уровней в диапазоне «нормальных» или не имеющих дефицит пациентов. Аналогично, пациентам, не имеющим выявляемые количества фермента, можно помогать путем обеспечения ферментной функции до менее чем 100% уровней активности и, необязательно, можно назначать дополнительное лечение после этого. В определенных вариантах осуществления, в которых генная функция обеспечивается донорной матрицей, пациенты могут экспрессировать более высокие уровни, чем «нормальные» здоровые субъекты. В других вариантах осуществления, в которых необходимо снижение генной экспрессии, уже от 20% до 50% снижения, или до около 100% снижения могут обеспечить необходимую пользу. Как описано в данном документе, описанную в данном документе терапию можно использовать в сочетании с другими вариантами лечения, т. е. стандартным лечением для диагноза субъекта (пациента).

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает назначение субъекту иммунодепрессивной сопутствующей терапии. Такую иммунодепрессивную сопутствующую терапию можно начинать до доставки гAAV или описанных композиций, например, если выявляют нежелательно высокие уровни антител к капсиду AAV. В определенных вариантах осуществления сопутствующую терапию также можно начинать до доставки гAAV в качестве меры предосторожности. В определенных вариантах осуществления иммунодепрессивную сопутствующую терапию начинают до доставки гAAV, например, если наблюдают нежелательный иммунный ответ после лечения.

Иммунодепрессанты для такой сопутствующей терапии включают, но не ограничиваются этим, глюкокортикоиды, стероиды, антиметаболиты, ингибиторы Т-клеток, макролиды (например, рапамицин или рапалог) и цитостатические агенты, включая алкилирующий агент, антиметаболит, цитотоксический антибиотик, антитело или агент, активный в отношении иммунофилина. Иммунодепрессант может включать преднизолон, азотистый иприт, нитрозомочевину, соединение на основе платины, метотрексат, азатиоприн, меркаптопурин, фторурацил, дактиномицин, антрациклин, митомицин С, блеомицин, митрамицин, направленные на рецептор IL-2 (CD25) или CD3 антитела, антитела к IL-2, циклоспорин, такролимус, сиролимус, IFN- β , IFN- γ , опиоид или агент, связывающий TNF- α (фактор некроза опухолей альфа). В определенных вариантах осуществления иммунодепрессивную терапию можно начинать за 0, 1, 2, 7 или более дней до введения гAAV или через 0, 1, 2, 3, 7 или более дней после введения гAAV. Такая терапия может включать один лекарственный препарат (например, преднизолон) или совместное введение двух или более лекарственных препаратов (например, преднизолона, микофенолата мофетила (MMF) и/или сиролимуса (т. е. рапамицина)) в один день. Прием одного или более из этих лекарственных препаратов можно продолжать после применения генной терапии в той же дозе или скорректированной дозе. Такая терапия может длиться около 1 недели (7 дней), двух недель, трех недель, около 60 дней или дольше при необходимости. В определенных вариантах осуществления выбирают схему без такролимуса.

В другом варианте осуществления способ включает совместное лечение стандартной терапией ОТС. Лечение дефицита ОТС сфокусировано, главным образом, на диетарном контроле уровней аммиака в крови для избежания гипераммониемии или для удаления избытка аммиака из кров во время эпизодов гипераммониемии ([HYPERLINK \l "_ENREF_83" \o "NORD, 2021 #2836" NORD, 2021](#)). Индивиды с дефицитом ОТС следуют диетарным ограничениям, ограничивающим потребление белка для контроля уровней аммиака в крови. Диетарные ограничения должны быть тщательно сбалансированы у грудных детей, которые должны потреблять достаточное количество белка, чтобы гарантировать нормальный рост, в то же время избегая избыточного потребления белка, которое может инициировать эпизод гипераммониемии ([HYPERLINK \l "_ENREF_12" \o "Berry, 2001 #2834" Berry and Steiner, 2001](#)). Следовательно, грудным детям назначают высококалорийную диету с низким содержанием белка с добавками незаменимых

аминокислот. При эпизодах гипераммониемии весь белок необходимо убирать из рациона пациента на 24 часа ([HYPERLINK \l "_ENREF_83" \o "NORD, 2021 #2836" NORD, 2021](#)).

Существует несколько медицинских препаратов, разработанных для стимуляции удаления азота из кровотока. Фенилбутират натрия (Буфенил) одобрен Управлением по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств США (FDA) для лечения хронической гипераммониемии у пациентов с дефицитом ОТС. После метаболизации буфенил превращается в фенилацетат, который конъюгируется с глутамином с образованием фенилацетилглутамина, который выводится почками, обеспечивая альтернативный путь выведения азота. Фенилбутират глицерина (Равикти) также одобрен FDA для лечения хронической гипераммониемии у пациентов с нарушениями цикла мочевины. Как и буфенил, равикти превращается в фенилацетат и следует такому же механизму для выведения азота ([HYPERLINK \l "_ENREF_65" \o "Lichter-Konecki, 1993 #2835" Lichter-Konecki et al., 1993](#); [HYPERLINK \l "_ENREF_40" \o "Gordon, 2003 #2833" Gordon, 2003](#); [HYPERLINK \l "_ENREF_71" \o "Magellan, 2021 #2831" Magellan, 2021](#)). И наконец, аммонул (фенилбутират глицерина и бензоат натрия) одобрен FDA как вспомогательная терапия для лечения острой гипераммониемии у пациентов с нарушениями цикла мочевины. Компонент фенилацетата натрия аммонула следует такому же механизму для выведения азота, что и метаболит фенилацетат, создаваемый буфенилом и равикти. Компонент бензоата натрия аммонула конъюгируется с глицином с образованием гиппуровой кислоты, которая выводится почками с удалением азота посредством этого процесса. Бензоат натрия также назначают в виде перорального препарата для долгосрочного поддержания при дефиците ОТС и часто предпочитают буфенилу и равикти, поскольку считается, что он имеет меньше побочных эффектов ([HYPERLINK \l "_ENREF_65" \o "Lichter-Konecki, 1993 #2835" Lichter-Konecki et al., 1993](#)).

В одном аспекте предложен способ лечения пациента, имеющего дефицит орнитинтранскарбамилазы (ОТС), используя нуклеазную экспрессионную кассету, содержащую кодирующую мегануклеазу последовательность, которая распознает сайт в человеческом гене PCSK9, под управление промотора, как описано в данном документе. Этот способ дополнительно включает введение экспрессионной кассеты, кодирующей трансген ОТС с SEQ ID NO: 17, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с ней, как описано в данном документе. Такие экспрессионные кассеты можно доставлять посредством вирусного или невирусного вектора. В определенных вариантах осуществления экспрессионные кассеты можно доставлять, используя ЛНЧ. Кодирующая последовательность нативного человеческого ОТС приведена в SEQ ID NO: 30. SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 30 имеют около 75,89% идентичности.

В другом аспекте предложен способ лечения пациента, имеющего дефицит орнитинтранскарбамилазы (ОТС), используя нуклеазную экспрессионную кассету, содержащую оgPHK и кодирующую Cas9 последовательность, которая распознает сайт в человеческом гене PCSK9. Этот способ дополнительно включает введение экспрессионной кассеты, кодирующей трансген ОТС с SEQ ID NO: 17, или

последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с ней, как описано в данном документе. Такие экспрессионные кассеты можно доставлять посредством вирусного или невирусного вектора. В определенных вариантах осуществления экспрессионные кассеты можно доставлять, используя ЛНЧ.

Существует ряд анализов для измерения экспрессии и уровней активности ОТС *in vitro*. Смотрите, например, X Ye, *et al*, 1996 Prolonged metabolic correction in adult ornithine transcarbamylase-deficient mice with adenoviral vectors. *J Biol Chem* 271:3639-3646) или *in vivo*. Например, активность фермента ОТС можно измерять, используя метод жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии с разведением стабильного изотопа для выявления образования цитруллина, нормализованного к [1,2,3,4,5-¹³C₅] цитруллину (98% ¹³C). Этот метод адаптирован из ранее разработанного анализа для выявления активности N-ацетилглутаматсинтазы [Morizono H, *et al*, Mammalian N-acetylglutamate synthase. *Mol Genet Metab.* 2004;81(Suppl 1):S4-11.]. Срезы свежемороженой печени взвешивают и быстро гомогенизируют в буфере, содержащем 10 мМ ГЭПЭС, 0,5% Тритон X-100, 2,0 мМ ЭДТУ и 0,5 мМ ДТТ. Объем буфера для гомогенизации доводят до получения 50 мг/мл ткани. Ферментативную активность измеряют, используя 250 мкг ткани печени в 50 мМ Трис-ацетата, 4 мМ орнитина, 5 мМ карбамилфосфата, pH 8,3. Ферментативную активность инициируют добавлением свежеприготовленного 50 мМ карбамилфосфата, растворенного в 50 мМ Трис-ацетате, pH 8,3, оставляют на 5 минут при 25°C и гасят добавлением эквивалентного объема 5 мМ ¹³C₅-цитруллина в 30% ТСА. Дебрис отделяют путем 5-минутного микроцентрифугирования, а супернатанты переносят в флаконы для масс-спектрометрии. Десять микролитров образца вводят в ЖХ-МС устройство Agilent 1100 в изократических условиях с подвижной фазой из 93% растворителя А (1 мл трифторуксусной кислоты в 1 л воды):7% растворителя В (1 мл трифторуксусной кислоты в 1 л 1:9 смеси вода:ацетонитрил). Пики, соответствующие цитруллину [соотношение масса:заряд (*m/z*) 176,1] и ¹³C₅-цитруллину (181,1 *m/z*), количественно оценивают, а их соотношение сравнивают с соотношениями, полученными для стандартной кривой опыта с цитруллином для каждого анализа. Образцы нормализуют к общей ткани печени или к концентрации белка, определенной с использованием набора для анализа белка Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Также можно использовать другие анализы, для которых не требуется биопсия печени. Одним из таких анализов является анализ плазменных аминокислот, в котором оценивают соотношение глутамина и цитруллина и, если уровень глутамина является высоким (> 800 микролитров/литр), а цитруллина - низким (например, единицы), подозревается нарушение цикла мочевины. Можно измерять плазменные уровни аммиака, при этом концентрация около 100 микролитров на литр указывает на ДОТК. В случае наличия у пациента гипервентиляции можно оценивать уровень газа в крови; респираторный алкалоз является частым при ДОТК. Оротовая кислота в моче, например, более чем около 20 микромолей на миллимоль креатинина, указывает на ДОТК, как и повышенный уровень оротата в моче после теста со стимуляцией аллопуринолом. Диагностические

критерии для ДОТК были установлены в Tuchman *et al*, 2008, Urea Cycle Disorders Consortium (UCDC) of the Rare Disease Clinical Research Network (RDCRN). Tuchman M, *et al.*, Consortium of the Rare Diseases Clinical Research Network. Cross-sectional multicenter study of patients with urea cycle disorders in the United States. *Mol Genet Metab.* 2008;94:397-402, которые включены в данный документ посредством ссылки. Также смотрите <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK154378/>, где приведено обсуждение текущих стандартов лечения для ДОТК.

В определенных вариантах осуществления нуклеазную экспрессионную кассету, невирусный вектор, вирусный вектор (например, rAAV) или любые из них в фармацевтической композиции, описанной в данном документе, можно вводить для редактирования генов у пациента. В определенных вариантах осуществления способ применим для неэмбрионального редактирования генов. В определенных вариантах осуществления пациент является грудным ребенком (например, от рождения до около 9 месяцев). В определенных вариантах осуществления пациент старше грудного возраста, например, 12 месяцев или старше.

В контексте данного документа термин в единственном числе может означать более чем один. Например, «клетка» может означать одну клетку или совокупность клеток.

В контексте данного документа термин «специфичность» означает способность нуклеазы распознавать и расщеплять двухцепочечные молекулы ДНК только в конкретной последовательности пар оснований, называемой последовательностью распознавания, или только в конкретной группе последовательностей распознавания. Эта группа последовательностей распознавания имеет определенные общие консервативные позиции или мотивы последовательностей, но может быть вырожденной в одной или более позициях. Высокоспецифическая нуклеаза способна расщеплять только одну или очень малое количество последовательностей распознавания. Специфичность можно определять любым способом, известным в данной области техники.

Сокращение «sc» относится к самокомплементарности. «Самокомплементарный AAV» относится к конструкции, в которой последовательность нуклеиновой кислоты кодирующей области, которую несет рекомбинантный AAV, была сконструирована с возможностью образования внутримолекулярной двухцепочечной ДНК-матрицы. После инфицирования, вместо ожидания клеточного синтеза второй цепи, две комплементарные половины scAAV будут ассоциировать с образованием одной двухцепочечной ДНК (дцДНК)-единицы, готовой для незамедлительной репликации и транскрипции. Смотрите, например, D M McCarty *et al*, “Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis”, *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, стр. 1248-1254. Самокомплементарные AAV описаны, например, в патентах США №№ 6596535; 7125717; и 7456683, каждый из которых в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки.

В контексте данного документа термин «функционально связанные» относится как

к регулирующим экспрессию последовательностям, которые являются непрерывными с представляющим интерес геном, так и регулирующим экспрессию последовательностям, которые действуют в транс-положении или на расстоянии, регулируя представляющий интерес ген.

Термин «экзогенный», используемый для описания последовательности нуклеиновой кислоты или белка, означает, что нуклеиновая кислота или белок не встречаются в природе в положении, в котором они находятся в хромосоме или клетке-хозяине. Экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты также относится к последовательности, полученной из одной экспрессионной кассеты или клетки-хозяина и вставленной в нее же, но которая находится в неприродном состоянии, например, имеет другое число копий или находится под управлением других регуляторных элементов.

Термин «гетерологичный», используемый в отношении белка или нуклеиновой кислоты, указывает на то, что белок или нуклеиновая кислота содержат две или более последовательностей или подпоследовательностей, которые не встречаются в природе в такой же взаимосвязи. Например, нуклеиновая кислота, как правило, получена рекомбинантно и имеет две или более последовательностей из неродственных генов, упорядоченные так, чтобы создать новую функциональную нуклеиновую кислоту. Например, в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота имеет промотор из одного гена, расположенный так, чтобы управлять экспрессией кодирующей последовательности из другого гена.

В контексте данного документа термин «клетка-хозяин» может относиться к пакующей линии клеток, в которой вектор (например, рекомбинантный AAV) получен из вырабатывающей плазмиды. В альтернативном варианте термин «клетка-хозяин» может относиться к любой клетке-мишени, в которой необходима экспрессия трансгена. Таким образом, «клетка-хозяин» относится к прокариотической или эукариотической клетке, которая содержит экзогенную или гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая была внесена в клетку любым способом, например, посредством электропорации, осаждения фосфатом кальция, микроинъекции, трансформации, инфицирования вирусом, трансфекции, липосомной доставки, методик мембранного слияния, высокоскоростных покрытых ДНК пеллет, инфицирования вирусом или слияния протопластов. В определенных вариантах осуществления в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к культурам клеток различных видов млекопитающих для *in vitro* оценки композиций, описанных в данном документе. В других вариантах осуществления в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, используемым для создания и упаковки вирусного вектора или рекомбинантного вируса. В другом варианте осуществления подразумевается, что термин «клетка-хозяин» относится к клеткам-мишеням субъекта, проходящего *in vivo* лечение заболеваний или патологических состояний, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления «клетка-хозяин» представляет собой клетку печени или гепатоцит.

«Субъект» представляет собой млекопитающее, например, человека, мышь, крысу,

морскую свинку, собаку, кошку, лошадь, корову, свинью или отличного от человека примата, такого как обезьяна, шимпанзе, бабуин или горилла. Пациент относится к человеку. Ветеринарный субъект относится в отличному от человека млекопитающему. В определенных вариантах осуществления субъект не имеет дефекта в гене PCSK9.

«Дефективный по репликации вирус» или «вирусный вектор» относится к синтетической или искусственной вирусной частице, в которой экспрессионная кассета, содержащая представляющий интерес ген, упакована в вирусный капсид или оболочку, при этом любые геномные вирусные последовательности, также упакованные в вирусный капсид или оболочку, являются дефективными по репликации, т. е. они не могут создавать дочерние вирионы, но сохраняют способность инфицировать клетки-мишени. В одном варианте осуществления геном вирусного вектора не содержит генов, кодирующих ферменты, необходимые для репликации (геном может быть сконструирован «выпотрошенным», то есть содержащим только представляющий интерес ген, фланкируемый сигналами, необходимыми для амплификации и упаковки искусственного генома), но эти гены можно обеспечивать во время получения. Следовательно, он считается безопасным для применения в генной терапии, поскольку репликация и инфицирование дочерними вирионами не могут происходить, за исключением случая наличия вирусного фермента, необходимого для репликации.

Термины «идентичность последовательности», «процент идентичности последовательности» или «процент идентичности» в контексте последовательностей нуклеиновых кислот относятся к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия. Длина сравнения идентичности последовательности может превышать полную длину генома, быть равной полной длине кодирующей ген последовательности, или необходим фрагмент из по меньшей мере 500-5000 нуклеотидов. Однако также может быть необходимым определение идентичности среди меньших фрагментов, например, из по меньшей мере около девяти нуклеотидов, обычно меньшей мере около 20-24 нуклеотидов, меньшей мере около 28-32 нуклеотидов, меньшей мере около 36 или более нуклеотидов. Аналогично, «процент идентичности последовательности» легко можно определить для аминокислотных последовательностей на протяжении полной длины белка или его фрагмента. Предпочтительно, фрагмент составляет по меньшей мере около 8 аминокислот в длину и может составлять до около 700 аминокислот. Примеры подходящих фрагментов описаны в данном документе.

Термин «существенная гомология» или «существенное сходство», относящийся к аминокислотам или их фрагментам, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими аминокислотными вставками или делециями с другой аминокислотой (или ее комплементарной цепью) идентичность аминокислотной последовательности существует в по меньшей мере около 95-99% выровненных последовательностях. Предпочтительно гомология существует на протяжении полной длины последовательности или белка, например, белка сар, белка гер, или их фрагмента,

который составляет по меньшей мере около 8 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 15 аминокислот в длину. Примеры подходящих фрагментов описаны в данном документе.

Под термином «высококонсервативный» подразумевается по меньшей мере около 80% идентичности, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности, более предпочтительно более 97% идентичности. Специалист в данной области техники легко определяет идентичность с помощью алгоритмов и компьютерных программ, известных специалистам в данной области техники.

В общем случае, при упоминании «идентичности», «гомологии» или «сходства» между двумя разными аденоассоциированными вирусами, «идентичность», «гомология» или «сходство» определяют в отношении «выровненных» последовательностей. «Выровненные последовательности» или «выравнивания» относятся к совокупности последовательностей нуклеиновых кислот или белковых (аминокислотных) последовательностей, часто содержащих коррекцию в отношении отсутствующих или дополнительных оснований или аминокислот по сравнению с референтной последовательностью. В примерах выравнивание AAV проводят, используя опубликованные последовательности AAV9 в качестве референтной точки. Выравнивание проводят, используя любую из ряда общедоступных или коммерчески доступных программ для множественного выравнивания последовательностей. Примеры таких программ включают «Clustal Omega», «Clustal W», «CAP Sequence Assembly», «MAP» и «MEME», которые доступны на веб-серверах в интернете. Другие источники таких программ известны специалистам в данной области техники. В альтернативном варианте также используют утилиты Vector NTI. Также существует ряд алгоритмов, известных в данной области техники, которые можно использовать для определения идентичности нуклеотидных последовательностей, включая содержащиеся в вышеописанных программах. В качестве другого примера, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать, используя Fasta™, программу в GCG версии 6.1. Fasta™ обеспечивает выравнивание и определение процента идентичности областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой и поисковой последовательностями. Например, процент идентичности последовательности между последовательностями нуклеиновых кислот можно определять, используя Fasta™ с параметрами по умолчанию (размер слова 6 и фактор NOPAM для весовой матрицы), предоставленную в GCG версии 6.1, включенную в данный документ посредством ссылки. Программы для множественного выравнивания последовательностей также доступны для аминокислотных последовательностей, например, программы «Clustal Omega», «Clustal X», «MAP», «PIMA», «MSA», «BLOCKMAKER», «MEME» и «Match-Box». В общем случае любые из этих программ используют с настройками по умолчанию, хотя специалист в данной области техники может при необходимости изменять эти настройки. В альтернативном варианте специалист в данной области техники может использовать другие алгоритм или компьютерную программу, которые обеспечивают по меньшей мере такой же уровень

идентичности или выравнивания, что и упомянутые алгоритмы и программы. Смотрите, например, J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13):2682-2690 (1999).

В контексте данного документа термин «около» относится к вариации $\pm 10\%$ от указанного целого числа и промежуточным значениям. Например, «около» 40 пар оснований включает ± 4 (т. е. 36-44, что включает целые числа 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44). В случае других значений, в частности процентного значения (например, 90% идентичности, около 10% вариации или около 36% несовпадений), термин «около» включает все значения в пределах диапазона, как целые, так и дробные.

В тексте данного описания различные аспекты изобретения можно представить в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазонов сделано исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема изобретения. Соответственно, описание диапазона следует понимать как описание всех возможных поддиапазонов, а также отдельных числовых значений в пределах этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует понимать как описание поддиапазонов, таких как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельных числовых значений в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применимо вне зависимости от ширины диапазона.

В контексте данного описания и формулы изобретения термины «содержащий», «имеющий», «включающий» и их варианты подразумевают включение других компонентов, элементов, целых чисел, этапов и т. п. И наоборот, термин «состоящий» и его варианты подразумевает исключение других компонентов, элементов, целых чисел, этапов и т. п.

Если не указано иное, в данном описании технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники и присутствует в опубликованных текстах, которые обеспечивают для специалиста в данной области техники общее руководство по многим терминам, используемым в настоящей заявке.

ПРИМЕРЫ

Дефицит орнитинтранскарбамилазы (ОТС) представляет собой X-сцепленное нарушение цикла мочевины, связанное с высокой летальностью. Хотя это и перспективное лечение для дефицита ОТС с поздним началом, неонатальная генная терапия аденоассоциированным вирусом (AAV) обеспечит только краткосрочный терапевтический эффект из-за утраты неинтегрированного генома во время пролиферации гепатоцитов. Опосредованная нуклеазой сайт-специфическая интеграция кассеты минигена ОТС в безопасный приемный сайт в геноме обеспечит долгосрочную терапевтическую пользу для пациентов с дефицитом ОТС. Одним из безопасных приемных сайтов для генного нацеливания является ген PCSK9, например, в области экзона 7. Нуклеазы могут представлять собой сконструированную мегануклеазу,

нацеленную на PCSK9 (ARCUS2), или CRISPR/Cas9 со специфической огРНК, нацеленной на PCSK9. Донорный вектор содержит миниген, содержащий печеночно-специфический промотор, такой как промотор TBG, кодон-оптимизированную кодирующую последовательность hOTC и последовательность поли-А. Как нуклеазу, так и донорную матрицу можно доставлять с помощью AAV-векторов (двойная AAV-векторная система). Продемонстрированы стойкая экспрессия трансгена и эффективное генное нацеливание в 12% гепатоцитов через 12 недель после однократной внутривенной инъекции двойных AAV-векторов новорожденным отличным от человека приматам (ОЧП). Миниген в донорном векторе фланкируется плечами обусловленной гомологией рекомбинации (HDR).

Впервые продемонстрировано на ОЧП *in vivo* опосредованное нуклеазой генное нацеливание на локус PCSK9 для экспрессии терапевтического белка после однократной инъекции двойных AAV-векторов новорожденным или детенышам. Композицию донорного вектора, содержащего миниген ОТС для генного нацеливания на локус PCSK9 человека/ОЧП, не исследовали в клинических условиях для лечения дефицита ОТС. Мы исследуем донорные векторы hOTC на новорожденных ОЧП в отношении эффективности генного нацеливания и на новорожденных трансгенных мышах с дефицитом ОТС в отношении эффективности.

В случае многих метаболических заболеваний необходимы раннее вмешательство и терапия; при этом AAV-опосредованная неонатальная генная терапия является нестабильной вследствие быстрой пролиферации печени на неонатальной стадии и неинтегрирующей природы AAV-вектора. Нацеленная интеграция кассеты терапевтического минигена в безопасный приемный сайт приведет к стойкой экспрессии терапевтического гена на геномном уровне, и при этом терапевтические эффекты будут сохраняться при клеточном делении. В случае многих метаболических заболеваний, таких как дефицит ОТС, необходимо достичь достаточной эффективности трансдукции для клинической пользы.

Мы описываем подход редактирования генома для лечения дефицита орнитинтранскарбамилазы (ДОТК), который может приводить к летальным эпизодам гипераммониемии в грудном возрасте. Целью редактирования генома является продолжительный терапевтический эффект, достигаемый у всех пациентов с ДОТК независимо от их мутации. Мы предлагаем осуществлять это путем лечения выживших новорожденных двумя AAV-векторами: одним для доставки нуклеазы для создания двухцепочечного разрыва в безопасном приемном сайте и вторым для доставки минигена ОТС для нокина в этот сайт. Мы предполагаем, что делящиеся гепатоциты печени новорожденного будут передавать эффективный нокин гена ОТС и будут элиминировать посредством разрежения геномы с неинтегрированным вектором. Мы решили использовать ген PCSK9 в качестве безопасного приемного сайта и мегануклеазу, называемую ARCUS, для нацеливания на него на основании нашей предшествующей работы на взрослых макаках, которая показала безопасное, эффективное и стабильное

снижение PCSK9 после AAV-доставки ARCUS. Наши начальные исследования редактирования генома для ДОТК проводились на мышах с дефицитом ОТС, которых сделали восприимчивыми к нуклеазе PCSK9 ARCUS посредством модификации зародышевой линии экзона 7 эндогенного гена PCSK9. Инъекция двух векторов новорожденным мышам привела к эффективному нокину минигена ОТС человека и защите от летальной гипераммониемии при стимуляции диетой с высоким содержанием белка. При подготовке к клиническим исследованиям мы оценили ключевые параметры безопасности и эффективности у новорожденных и детенышей макаков. Всего 24 животных обрабатывали AAV-векторами с анализом для включения изучения биопсии печени через 3 и 12 месяцев. В этих исследованиях мы оценивали влияние следующих параметров на эффективности редактирования и токсичность: трансген (человеческий фактор IX и человеческий ОТС), промоторы, управляющие ARCUS, капсиды клады E, длина донора, фланкирующего трансген, и возраст макака во время введения дозы. В данном документе мы представляем предварительные данные по 16/24 животным, которые включают, как минимум, результаты биопсии через 3 месяца. Мы обнаружили, что инъекция AAV-векторов была довольно безопасна с отсутствием признаков повышения трансаминаз или гистопатологии печени у любых из обработанных ARCUS животных. Ключевым показателем эффективности в модели на приматах является эффективность трансдукции, измеряемая посредством гибридизации *in situ* и иммуноокрашивания, для выявления клеток, экспрессирующих мРНК и белок ОТС человека, соответственно. Наиболее высокие и наиболее согласованные результаты были получены с векторами с использованием капсида новой клады E и управления ARCUS промотором TBG в первом векторе и использованием 500 п. о. фланкирующих плеч гомологии в донорном векторе. С этой комбинацией мы достигли $10,0 \pm 6,4\%$ (N=6) трансдукции, что выше порога, который, по нашему мнению, может обеспечить существенную пользу для пациентов, который составляет ~ 5% экспрессирующих ОТС клеток. Предварительные данные позволяют предположить, что уровень редактирования остается стабильным в течение одного года и что эффективную нацеленную вставку можно обеспечить при инъекции макакам возрастом до 3 месяцев. Молекулярный анализ целевого локуса PCSK9 позволяет предположить, что подавляющее большинство нокина векторного генома происходило посредством негомологичного соединения концов (НГСК), а не гомологичной репарации (ГР). В целом, существенная неудовлетворенная потребность лечения неонатальной формы ДОТК служит основанием для рассмотрения экспериментальных вариантов терапии, таких как редактирование генома, описанное в данном отчете.

ПРИМЕР 1 - МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и методы

AAV-векторы конструировали в соответствии с ранее установленными процедурами и инструкциями производителя. Капсид AAVhu37 использовали для экспериментов, описанных в данном документе, где это указано.

Все процедуры, проводимые с животными, проводили в соответствии с

протоколами, одобренными Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию Университета Пенсильвании.

ПРИМЕР 2 - ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОКИН МИНИГЕНА hFIX В ЛОКУС PCSK9 С ПОМОЩЬЮ ARCUS2 ИЛИ SaCas9 У НОВОРОЖДЕННЫХ ОЧП

В этом исследовании мы оценивали целевое (PSK9) SaCas9- или ARCUS-опосредованное редактирование генов и эффективность нокина минигена hFIX или OTC у новорожденных отличных от человека приматов (ОЧП). На Фиг. 1 проиллюстрировано схематическое представление локуса rhPCSK9, иллюстрирующее донорный сайт сплайсинга в экзоне 7, донорный вектор HDR, содержащий представляющую интерес донорную матрицу, например, hFIX, hOTC. Кроме того, на Фиг. 3А-3С проиллюстрировано схематическое представление двойной AAV-векторной системы для SaCas9- или ARCUS-опосредованной коррекции генов. На Фиг. 3А проиллюстрировано схематическое представление двойной AAVhu37-векторной системы для ARCUS2-опосредованной коррекции генов, при этом донорный AAVhu37-вектор содержит последовательность донорной матрицы hOTC. На Фиг. 3В проиллюстрировано схематическое представление двойной AAVhu37-векторной системы для Sa-Cas9-опосредованной коррекции генов (транс; AAVhu37-SaCas9), при этом донорный AAV.hu37.shRNA-вектор содержит последовательность донорной матрицы hOTC. На Фиг. 3С проиллюстрировано схематическое представление двойной AAVhu37-векторной системы для Sa-Cas9-опосредованной коррекции генов (цис; AAVhu37.PCSK9-sgRN.SaCas9), при этом донорный AAV.hu37-вектор содержит последовательность донорной матрицы hOTC.

Вышеописанные двойные AAVhu37-векторы, содержащие нуклеазную матрицу для редактирования генов и донорную матрицу, использовали на новорожденных ОЧП, чтобы исследовать нокин минигена hFIX в локусе PCSK9, опосредованный SaCas9 или ARCUS2. AAVhu37-вектор для редактирования генов доставляли в дозе 1×10^{13} ГК/кг, а AAVhu37-вектор донорной матрицы доставляли в дозе 3×10^{13} ГК/кг. В целом, было три группы обработки ОЧП: 1) AAVhu37.EGFP и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX.U6.sgR; 2) AAVhu37.ARCUS2 и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX; 3) AAVhu37.SaCas9 и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX.U6.sgR. На Фиг. 2 проиллюстрирован график пилотного исследования, включающего нокин минигена hFIX в локусе PCSK9 посредством ARCUS2 или SaCas9 у новорожденных ОЧП. В этом исследовании инъекции ОЧП проводили в день 0, образцы крови брали каждые 2-4 недели (для исследования сывороточной химии, экспрессии hFIX в плазме, уровней PCSK9 в сыворотке, уровней LDL и уровней нейтрализующих антител (NAb)), первую биопсию проводили в день 84 (для исследования уровней векторного генома, уровней генной экспрессии, целевого и нецелевого редактирования и гистологии).

In vivo исследование опосредованного нуклеазой генного нацеливания проводили на новорожденных и детенышах ОЧП. Животным вводили 1×10^{13} ГК/кг AAVhu37.ARCUS2.WPRE и 3×10^{13} ГК/кг AAVhu37.hFIXco-HDR или 1×10^{13} ГК/кг AAVhu37.SaCas9.WPRE и 3×10^{13} ГК/кг AAVhu37.hFIXco-HDR.U6.sgR или 1×10^{13} ГК/кг

AAVhu37.GFP.WPRE и 3×10^{13} ГК/кг AAVhu37.hFIXco-HDR.U6.sgR, как проиллюстрировано на Фиг. 4А, 4В и 5G. На Фиг. 4С проиллюстрированы уровни hFIX в указанные моменты времени от дня 0 до 13 месяцев после обработки (приведенные в нг/мл). На Фиг. 4D проиллюстрированы уровни PCSK9 в указанные моменты времени от дня 0 до 12 месяцев после обработки (приведенные как процент от исходного уровня в день 0). На Фиг. 4Е проиллюстрированы уровни АЛТ (аланинаминотрансферазы) в указанные моменты времени от дня 0 до дня 196 после обработки (приведенные в Е/л). На Фиг. 4F проиллюстрированы уровни IgG к FIX в указанные моменты времени от дня 0 до дня 196 после обработки (приведенные в единицах коэффициента разведения, 1/разведение). На Фиг. 4G проиллюстрированы уровни PCSK9 в указанные моменты времени от дня 0 до дня 196 после обработки (приведенные в нг/мл). На Фиг. 4H проиллюстрирована масса, измеренная в указанные моменты времени от дня 0 до дня 196 после обработки (приведенная в г). На Фиг. 5А проиллюстрированы уровни hFIX в указанные моменты времени (приведенные в нг/мл) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5В проиллюстрированы уровни PCSK9 в указанные моменты времени (приведенные в процентах от исходного уровня в день 0) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5С проиллюстрированы уровни АЛТ (аланинаминотрансферазы) в указанные моменты времени (приведенные в Е/л) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5D проиллюстрированы уровни IgG к FIX в указанные моменты времени (приведенные в единицах коэффициента разведения, 1/разведение) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5Е проиллюстрированы уровни PCSK9 в указанные моменты времени (приведенные в нг/мл) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5F проиллюстрирована измеренная масса в указанные моменты времени (приведенная в г) у детенышей ОЧП. На Фиг. 5G приведена сводная таблица с данными по эксперименту, описанному на Фиг. 4А-5G. На Фиг. 5H проиллюстрировано сравнение различных данных между исследованными новорожденными ОЧП и детенышами ОЧП.

На Фиг. 6А-6Е проиллюстрированы трансдукция вектора (ГК) и экспрессия трансгена в образцах биопсии печени, полученных в указанные дни после обработки у НЧП. 6А проиллюстрированы уровни трансдукции вектора в образцах биопсии печени, приведенные в единицах геномных копий AAV (ГК) на диплоидную клетку. На Фиг. 6В проиллюстрирована относительная экспрессия РНК трансгена в образцах биопсии печени. На Фиг. 6С проиллюстрирована двойная гибридизация *in situ* (ISH, англ. «*in situ hybridization*») с использованием специфических зондов для выявления FIX и ARCUS в образцах биопсии печени. На Фиг. 6D приведены цифровые изображения ISH, используемые для количественного определения трансдукции. На Фиг. 6Е проиллюстрирована эффективность трансдукции трансгена FIX по данным количественного определения методом ISH, которая приведена в процентах трансдукции. На Фиг. 6F проиллюстрировано количество геномных копий в печени. Более высокие значения ГК FIXco наблюдали у детенышей (3х) по сравнению с новорожденными в оба момента времени. Сниженное число ГК FIXco во 2-ой биопсии (1,5-2х), чем в 1-ой биопсии. На Фиг. 6G проиллюстрирована мРНК трансгена в биопсии печени. мРНК FIXco

была стабильной между 3 мес. и 1 г. у детенышей, тогда как мРНК FIX_{co} была снижена в 3 раза между 3 мес. и 1 г. у обработанных новорожденными животными. На Фиг. 6H приведены результаты молекулярного анализа образцов печени. Приведено количество инделов, определенное посредством секвенирования ампликона, и не-мишеней, определенное посредством секвенирования ИКП. Дополнительно приведены результаты нанопорового секвенирования длинных ридов для животного 20-196 в день 366. 0,6% ридов демонстрировали включение HDR с обеих сторон. На Фиг. 6I приведена сводная таблица с данными, описанными на Фиг. 6A-6H.

На Фиг. 7A-7L приведены данные двойной гибридизации *in situ* (ISH) с использованием специфических зондов для выявления FIX и ARCUS в образцах биопсии печени, полученных через 84 дня после обработки от ОЧП; изображения приведены при различном увеличении (ОЧП, обработанные AAVhu37.ARCUS2 и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX). На Фиг. 7A проиллюстрирован выявленный с помощью ISH ARCUS в образцах биопсии печени при 4x увеличении. На Фиг. 7B проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 4x увеличении. На Фиг. 7C приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ARCUS и hFIX при 4x увеличении. На Фиг. 7D проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ARCUS и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 4x увеличении. На Фиг. 7E проиллюстрирован выявленный с помощью ISH ARCUS в образцах биопсии печени при 10x увеличении. На Фиг. 7F проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 10x увеличении. На Фиг. 7G приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ARCUS и hFIX при 10x увеличении. На Фиг. 7H проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ARCUS и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 10x увеличении. На Фиг. 7I проиллюстрирован выявленная с помощью ISH экспрессия ARCUS в образцах биопсии печени при 20x увеличении. На Фиг. 7J проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 20x увеличении. На Фиг. 7K приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ARCUS и hFIX при 20x увеличении. На Фиг. 7L проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ARCUS и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 20x увеличении. Обобщенные данные по трансдукции вектора (ГК/диплоидный геном) приведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1.

| | ГК/диплоидный геном |
|--------------------------------------|---------------------|
| hFIX | 0,63 |
| ARCUS | 0,13 |
| Соотношение (FIX/ARCUS) | 4,8 |
| Соотношение дозы вектора (FIX/ARCUS) | 3,0 |

На Фиг. 8A-8M приведены данные двойной гибридизации *in situ* (ISH) с использованием специфических зондов для выявления FIX и ARCUS в образцах биопсии

печени, полученных через 84 дня после обработки от ОЧП; изображения приведены при различном увеличении (ОЧП, обработанные AAVhu37.EGFP и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX.U6.sgR). На Фиг. 8А проиллюстрирован выявленный с помощью ISH ЗФБ-WRPE в образцах биопсии печени при 4х увеличении. На Фиг. 8В проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 4х увеличении. На Фиг. 8С приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX при 4х увеличении. На Фиг. 8D проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 4х увеличении. На Фиг. 8Е проиллюстрирован выявленный с помощью ISH ЗФБ-WRPE в образцах биопсии печени при 10х увеличении. На Фиг. 8F проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 10х увеличении. На Фиг. 8G приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX при 10х увеличении. На Фиг. 8H проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 10х увеличении. На Фиг. 8I проиллюстрирован выявленная с помощью ISH экспрессия ЗФБ-WRPE в образцах биопсии печени при 20х увеличении. На Фиг. 8J проиллюстрирован выявленный с помощью ISH hFIX в образцах биопсии печени при 20х увеличении. На Фиг. 8K приведено наложенное изображение выявленных с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX при 20х увеличении. На Фиг. 8L проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 20х увеличении. На Фиг. 8M проиллюстрированы выявленные с помощью ISH ЗФБ-WRPE и hFIX в виде наложенного изображения с ДАФИ (окрашивание для ядер) при 20х увеличении в необработанном контроле. Обобщенные данные по трансдукции вектора (ГК/диплоидный геном) приведены в таблице 2 ниже.

Таблица 2.

| | ГК/диплоидный геном |
|--------------------------------------|---------------------|
| hFIX | 0,017 |
| ARCUS | 0,006 |
| Соотношение (FIX/ARCUS) | 2,7 |
| Соотношение дозы вектора (FIX/ARCUS) | 3,0 |

На Фиг. 9 проиллюстрировано ARCUS-опосредованное целевое редактирование у ОЧП, обработанных AAVhu37.ARCUS2 и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX. Через 84 дня после обработки получали образцы биопсии печени и рассчитывали процент общего количества инделов в целевой области. Кроме того, ARCUS-опосредованное целевое редактирование у ОЧП, обработанных AAVhu37.ARCUS2 и AAVhu37.Donor-HDR-hFIX. Через 84 дня после обработки получали образцы биопсии печени и рассчитывали частоту общего количества инделов в целевой области, приведенную как частота уникальных ридов UMI От относительно мишени. Обобщенные данные по количеству инделов, оцененному посредством секвенирования ампликона, приведены в таблице 3 ниже.

Таблица 3.

| ID | 20-196 (НР, д84) | 20-196 (НР, д366) | АН0120 (3м, д98) | RA3567 (контроль) |
|---------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| % инс. | 1,1 | 1,3 | 1,2 | 0,00 |
| % дел. | 9,2 | 10,9 | 13,2 | 0,04 |
| Общий % инделов | 10,2 | 12,1 | 14,4 | 0,04 |
| % HDR (LMU-сек.) | 2,8 | 2,0 | 1,2 | |

ПРИМЕР 3 - ARCUS2-ОПОСРЕДОВАННОЕ НАЦЕЛИВАНИЕ НА ГЕН НОТС У НОВОРОЖДЕННЫХ ОЧП

Новорожденных (1-16 дней) или детенышей (3-4 месяцев) макаков резус использовали для не согласующихся с GLP фармакологических исследований РОС. Мегануклеаза M2PCSK9 нацелена на 22 п. о. последовательность, присутствующую в гене *PCSK9* человека и макака-резус. Таким образом, макаков-резус можно использовать для оценки целевого редактирования (фармакологии) и безопасности/токсикологии. Кроме того, новорожденные и детеныши макаков-резус имеют схожие анатомические и физиологические характеристики с человеческими младенцами, что позволяет использовать предполагаемый клинический ПВ (в/в). Предполагается, что сходство в анатомии и ПВ приведет к получению репрезентативных профилей распределения и трансдукции вектора, что сделает возможной более аккуратную оценку фармакологии и токсичности исследуемого препарата, включая целевое и нецелевое редактирование и клиническую патологию, что невозможно при использовании новорожденных мышей.

В этом исследовании новорожденным ОЧП вводили векторы нуклеазы ARCUS2 и донорные векторы, имеющие плечи HDR различной длины - 500 п. о. плечо или более короткое плечо HDR. Схематическое изображение вектора приведено на Фиг. 11J. На Фиг. 12A приведена сводная таблица с данными по эксперименту. Все 14 новорожденных макаков хорошо переносили инфузии вектора (т. е. с отсутствием очевидных клинических осложнений) и набирали массу со временем (Фиг. 11I). Уровни печеночных ферментов находились в пределах нормального диапазона за исключением временного и умеренного повышения уровней АЛТ у некоторых животных в день 14 (Фиг. 11C).

Анализ в день 0 образцов плазмы, полученных от новорожденных перед введение дозы, показал, что у трех животных (21-111, 21-113, 21-122) были высокие уровни (≥ 400) связывающих антител к AAVrh79 (Фиг. 11A). Эти предсуществующие антитела к

AAVrh79 блокировали бы перенос гена AAV.

Уровни PCSK9 отслеживали у всех новорожденных животных, включая контрольных животных, которым вводили только донорный вектор, в течение времени. Уровни PCSK9 в день 0 варьировались среди новорожденных (Фиг. 11B). Девять животных демонстрировали тенденцию к снижению уровней PCSK9 после введения вектора, включая одно животное, которому вводили только донорный вектор, тогда как оставшиеся пять животных демонстрировали стойкое или временное повышение уровней PCSK9 после введения дозы, Фиг. 11B).

В день 84 получали биопсию печени путем лапаротомии. Эффективность трансдукции в печени оценивали посредством двойной ISH с hOTC- и M2PCSK9-специфическими зондами для выявления мРНК трансгена и посредством иммунофлуоресценции ОТС для выявления человеческого белка ОТС, с последующей количественной оценкой просканированных слайдов (Фиг. 11D). Трое животных (21-111, 21-113 и 21-122) с предсуществующими связывающими антителами к AAVrh79 во время введения дозы не демонстрировали ОТС-положительные гепатоциты по данным обоих методов. Двое контрольных животных, которым вводили только донорный вектор, демонстрировали низкий уровень ($\leq 1\%$) трансдукции hOTC. Наибольшая эффективность трансдукции (11,9 и 18,6% по данным иммунофлуоресценции ОТС) была выявлена у двух животных, которым совместно вводили донорные векторы AAVrh79.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bGH и AAVrh79.rhHDR.TBG.hOTCco.bGH (G6). Положительные hOTC-экспрессирующие гепатоциты также были обнаружены в кластерах. Эти уровни превышают порог для существенной пользы для пациентов, который составляет $\sim 5\%$ ОТС-экспрессирующих клеток.

Молекулярный анализ в день 84 образцов биопсии печени от каждого животного проводили для измерения числа копий трансгена на диплоидный геном, уровней экспрессии мРНК, целевого редактирования и нецелевого редактирования (Фиг. 11F). В соответствии с анализом эффективности трансдукции двое животных (21-157 и 21-175) в группе 6 имели наивысшее число ГК вектора hOTC (Фиг. 11F), мРНК hOTC (Фиг. 12I) и % целевых инделов (Фиг. 11H). ГК вектора M2PCSK9 у животных были в 2-7 раз ниже, чем ГК вектора hOTC, тогда как уровни мРНК M2PCSK9 были в 23 и 765 раз ниже, чем уровни мРНК hOTC (Фиг. 11F и 11G).

В этом исследовании нецелевая активность, оцениваемая посредством секвенирования ИКП, идентифицировала от 2 до 40 потенциальных не-мишеней в образцах биопсии печени в день 84. Некоторые нецелевые сайты были обнаружены у нескольких животных, включая детенышей hFIX и новорожденных животных hFIX в исследовании 2 и исследовании 3, соответственно. Нецелевое редактирование будет дополнительно охарактеризовано посредством секвенирования ампликона в потенциальных нецелевых сайтах.

В целом, мы идентифицировали комбинацию вектора M2PCSK9 и донорного вектора hOTCco, которая при совместном введении новорожденным макакам могла

обеспечивать 12-18,6% эффективности трансдукции в печени через 3 месяца после введения дозы, что выше порога для существенной пользы для пациентов, который составляет ~ 5% ОТС-экспрессирующих гепатоцитов. За животными из этого исследования наблюдают для оценки долгосрочной эффективности и безопасности. Мы проведем вторую биопсию печени через 1 год после введения дозы, чтобы оценить стабильность трансдукции hОТС, гистопатологию в печени и целевое и нецелевое нацеливание в печени.

ПРИМЕР 4 - МЫШИНАЯ МОДЕЛЬ PCSK9-HE7-KI

Поскольку последовательность нацеливания M2PCSK9 в гене *PCSK9* человека и макака не является консервативной с мышинным геном *Pcsk9*, мы не можем использовать M2PCSK9 для редактирования генома в геномном локусе у мышей. Поэтому мы поручили Jackson Laboratory создать мышиную модель с нокином, который замещает область, включающую экзон 7 мышинного гена *Pcsk9*, областью человеческого гена *PCSK9*, содержащую экзон 7, названную мышью *PCSK9-hE7-KI* (Фиг. 10A-10C). Эту модель можно использовать для оценки *in vivo* редактирования генома и эффективности генного нацеливания. Затем мы скрестили мышью *PCSK9-hE7-KI* с мышами с редким серым мехом (*spf^{ash}*). Мыши *spf^{ash}* имеют точечную мутацию с G на A в донорном сайте сплайсинга в конце экзона 4 гена *Otc*, которая приводит к аномальному сплайсингу мРНК *Otc* и 20-кратному снижению экспрессии как мРНК, так и белка ОТС ([HYPERLINK \l "_ENREF_48" \o "Hodges, 1989 #2854" Hodges and Rosenberg, 1989](#)). Пораженные животные имеют 5-10% остаточной активности ОТС и могут выживать на пищевой диете, но у них развивается гипераммониемия, которая может быть летальной при диете с высоким содержанием белка ([HYPERLINK \l "_ENREF_119" \o "Yang, 2016 #2849" Yang et al., 2016](#)).

Мышиную модель *PCSK9-hE7-KI.spf^{ash}* можно использовать для оценки эффективности *in vivo* нацеливания на ген человеческого *ОТС* и демонстрации корреляции между эффективностью нацеливания и эффективностью. Однако, из-за небольшого размера новорожденных мышей оценку клинической патологии крови и клинической эффективности генного нацеливания можно проводить только после отлучения мышей от матери, после того как они набрали достаточную массу тела, и в качестве терминальной процедуры.

На Фиг. 12 проиллюстрировано выравнивание последовательностей для 265 п. о. последовательности, которая представляет последовательность *PCSK9* человека из аллели с нокином *PCSK9-hE7*, *PCSK9* (m*PCSK9*) мыши и *PCSK9* (rh*PCSK9*) макака-резус. Существует 6 несовпадений между последовательностями человека и резуса в этой 265 п. о. области. Последовательности грызунов и приматов различаются за пределами этого окна вследствие вставки различных LINE и LTR. Между человеком и мышью существует 2 аминокислотных отличия в экзоне 7. Мыши hE7-KI экспрессируют нормальные уровни m*PCSK9* по данным измерения ELISA.

ПРИМЕР 5 - IN VIVO НАЦЕЛИВАНИЕ ГЕНА ОТС НА ЛОКУС *PCSK9* У

ДЕТЕНЬШЕЙ PCSK9-HE7-KI.SPF^{ASH}

Целью этого текущего не согласующегося с GLP фармакологического исследования является оценка, может ли опосредованный мегануклеазой M2PCSK9 нокин человеческого гена *OTC* у новорожденных мышей PCSK9-hE7-KI.spf^{ash} обеспечить экспрессию терапевтического человеческого OTC в целевой ткани для лечения дефицита OTC (печень) после однократного совместного введения экспрессирующего нуклеазу M2PCSK9 вектора и донорного вектора человеческого *OTC* посредством предполагаемого клинического ПВ (в/в). Схема экспериментального дизайна показана на Фиг. 14А, а группы дозировок показаны на Фиг. 14В.

В день 0 новорожденным (PND 1-2) самцам мышей PCSK9-hE7-KI.spf^{ash} в/в совместно вводили AAVrh79-вектор, экспрессирующий мегануклеазу M2PCSK9 (AAVrh79.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bGH), в дозе $1,0 \times 10^{13}$ ГК/кг в комбинации с одним из трех разных донорных AAVrh79-векторов hOTCco в дозе $3,0 \times 10^{13}$ ГК/кг. Экспрессирующий мегануклеазу M2PCSK9 вектор, оцениваемый в этом исследовании (AAVrh79.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bGH), был идентичным основному клиническому кандидату, тогда как каждый донорный вектор hOTCco был идентичным основному клиническому кандидату за исключением плеч HDR. В частности, хотя клинический кандидат содержит длинную версию человеческой последовательности HDR (AAVrh79.hHDR.TBG.hOTCco.bGH), донорные векторы hOTCco, оцениваемые в этом исследовании, содержали мышино-человеческую гибридную последовательность HDR (AAVrh79.mhHDR.TBG.hOTCco.bGH), более короткую версию человеческой последовательности HDR (AAVrh79.shHDR.TBG.hOTCco.bGH) или не содержали последовательности HDR (AAVrh79.TBG.hOTCco.bGH). На Фиг. 13 приведено сравнение гомологии плеч HDR с последовательностями человека, мыши с нокином и ОЧП. В качестве отрицательного контроля дополнительным совпадающим по возрасту мышам PCSK9-hE7-KI.spf^{ash} вводили AAVrh79-вектор, не экспрессирующий мегануклеазу (AAVrh79.TBG.PIEGFP.WPRE.bGH), в комбинации с AAVrh79.mhHDR.TBG.hOTCco.bGH.

Прижизненные оценки включали отслеживание жизнеспособности, проводимое ежедневно, измерения массы тела, оценку плазменного PCSK9 и уровней NH₃ в плазме и оротовой кислоты в моче после стимуляции диетой с высоким содержанием белка и частичной гепатэктомией в день 120 для оценки стабильности трансдукции человеческого *OTC* с последующей частичной гепатэктомией двух третей. В дни 49 и 170 подгруппу из каждой когорты стимулируют 10-дневной диетой с высоким содержанием белка с последующим вскрытием в конце стимуляции. При вскрытии извлекают печень для оценки нокина человеческого гена *OTC*, включая оценку экспрессии мРНК человеческого *OTC* (*in situ* гибридизация), экспрессии белка OTC (иммуоокрашивание) и активности фермента OTC, оцениваемой посредством окрашивания и/или анализа активности фермента. Печеночную ДНК выделяли для оценки целевого редактирования (секвенирование ампликона, Оксфордское нанопоровое секвенирование длинных ридов) и

оценки числа копий векторного генома.

Предварительные результаты показывают, что мыши, которым вводили векторы, имеющие плечи mhHDR, демонстрируют выживаемость, эквивалентную с мышами дикого типа, при этом обработанные shHDR мыши достигают 80% жизнеспособности после стимуляции 10-дневной диетой с высоким содержанием белка (Фиг. 14C). Все обработанные мыши сохраняли массу лучше, чем необработанные мыши KI-spf-ash (Фиг. 14D). Плазменные уровни аммиака mhHDR-обработанных мышей были значительно снижены по сравнению с необработанными мышами (Фиг. 14E).

Уровни mPCSK9 измеряли в день 48, при этом все обработанные мыши демонстрировали снижение (Фиг. 14F). Процент инделов был относительно сопоставимым среди типов HDR (Фиг. 14G). Уровни hOTC были повышены у мышей, обработанных shHDR и mhHDR (Фиг. 14H).

ПРИМЕР 6 - IN VIVO НАЦЕЛИВАНИЕ ГЕНА ОТС НА ЛОКУС *PCSK9* У НОВОРОЖДЕННЫХ МАКАКОВ-РЕЗУС

Целью этого текущего не согласующегося с GLP фармакологического исследования является оценка, может ли опосредованный мегануклеазой M2PCSK9 нокин человеческого гена *OTC* у новорожденных макаков-резус обеспечить экспрессию терапевтического человеческого ОТС в целевой ткани для лечения дефицита ОТС (печень) после однократного совместного введения экспрессирующего мегануклеазу M2PCSK9 вектора и донорного вектора человеческого *OTC* посредством предполагаемого клинического ПВ (в/в).

В день 0 новорожденным (от 1 до 16 дней) макакам-резус в/в совместно вводили один из двух разных векторов, экспрессирующих мегануклеазу M2PCSK9, в дозе $1,0 \times 10^{13}$ ГК/кг в комбинации с одним из двух разных донорных AAV-векторов hOTCco в дозе $3,0 \times 10^{13}$ ГК/кг. Безнуклеазная группа, которая получала только донорный AAV-вектор hOTCco в дозе $3,0 \times 10^{13}$ ГК/кг, была включена в качестве получавшего только донорный вектор контроля.

Для AAV-векторов, нацеленных на ген *PCSK9*, мы сравнивали две AAV-векторные конструкции, которые экспрессируют M2PCSK9 в печени. AAV.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bGH содержит полноразмерный промотор TBG и две копии энхансерных элементов, при этом WPRE экспрессирует более высокие уровни нуклеазы, чем AAV.TBG-S1-F113.PI.M2PCSK9.bGH, который содержит короткий и слабый промотор. Для донорных векторов hOTC мы сравнивали два донорных вектора AAV.hOTCco, которые отличаются по длине плеч гомологии, фланкирующих кассеты трансгена hOTCco.

ОЧП в день 0 в/в вводили два вектора и отслеживали ежедневно в отношении жизнеспособности. Прижизненные оценки включали измерение массы тела, клиническую патологию крови и анализ редактирования генов в плазме. Запланировано две процедуры лапаротомии для получения ткани печени для анализа эффективности редактирования генома, числа копий векторного генома, экспрессии трансгена, гистопатологии,

иммуноокрашивания и ISH-окрашивания РНК. За ОЧП будут проводить долгосрочное наблюдение и проводить вскрытие (дата подлежит определению), во время которого будут получены ткани их печени и других основных органов для оценки эффективности редактирования генома, числа копий векторного генома, экспрессии трансгена, гистопатологии, иммуноокрашивания и ISH-окрашивания РНК.

ПРИМЕР 7 - ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ВЕКТОРОВ У ДЕТЕНЬШЕЙ PCSK9-hE7-KI.SPF^{ASH}

Целью этого запланированного не согласующегося с GLP фармакологического исследования является оценка соотношения векторных компонентов, необходимого для достижения наивысшей эффективности опосредованного мегануклеазой M2PCSK9 нокина человеческого гена *OTC* у новорожденных мышей PCSK9-hE7-KI.spf^{ash} для лечения дефицита *OTC* (печень) после однократного совместного введения экспрессирующего нуклеазу M2PCSK9 вектора и донорного вектора человеческого *OTC* посредством предполагаемого клинического ПВ (в/в).

В день 0 новорожденным (PND 1-2) самцам мышей PCSK9-hE7-KI.spf^{ash} будут в/в совместно вводить AAVrh79-вектор, экспрессирующий мегануклеазу M2PCSK9 (AAVrh79.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bGH) в одной из трех доз в комбинации с одним из трех донорных векторов hOTCco, содержащих мышино-человеческую гибридную последовательность HDR (AAVrh79.mhHDR.TBG.hOTCco.bGH). Экспрессирующий мегануклеазу M2PCSK9 вектор, оцениваемый в этом исследовании (AAVrh79.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bH), является идентичным клиническому кандидату, тогда как донорный вектор hOTCco является идентичным клиническому кандидату за исключением плеч HDR. В частности, хотя клинический кандидат содержит длинную версию человеческой последовательности HDR (AAVrh79.hHDR.TBG.hOTCco.bGH), донорные векторы hOTCco, оцениваемые в этом исследовании, содержали мышино-человеческую гибридную последовательность HDR (AAVrh79.mhHDR.TBG.hOTCco.bGH).

Мышино-человеческая гибридная последовательность HDR в донорном векторе (AAVrh79.mhHDR.TBG.hOTCco.bGH) была выбрана для этого исследования, чтобы сделать возможной оценку фармакологии этого подхода, где донорная последовательность является непосредственно гомологичной последовательности у мышей PCSK9-hE7-KI.spf^{ash}.

Прижизненные оценки включают отслеживание жизнеспособности, проводимое ежедневно, измерения массы тела, оценку уровней NH₃ в плазме и оротовой кислоты в моче после стимуляции диетой с высоким содержанием белка. В день 81 мышей будут стимулировать 10-дневной диетой с высоким содержанием белка с последующим вскрытием в конце стимуляции. При вскрытии будут извлекать печень для оценки нокина человеческого гена *OTC*, включая оценку экспрессии мРНК человеческого *OTC* (*in situ* гибридизация), экспрессии белка *OTC* (иммуноокрашивание) и активности фермента *OTC*, оцениваемой посредством окрашивания и/или анализа активности фермента. Также

будут выделять печеночную ДНК для оценки целевого редактирования (секвенирование ампликона) и оценки числа копий векторного генома.

ПРИМЕР 8 - ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОЙ ДОЗЫ У ДЕТЕНЬШЕЙ PCSK9-HE7-KI.SPF^{ASH}

Целью этого запланированного не согласующегося с GLP фармакологического исследования является оценка эффективности и определение МЭД вводимого в/в AAV в модели новорожденных мышей PCSK9-hE7-KI.spf^{ash}. AAVrh79-вектор, экспрессирующий мегануклеазу M2PCSK9 (AAVrh79.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bGH), будет партией вектора для оценки токсикологии, которую будут производить для запланированного согласующегося с GLP исследования токсикологии. Вместо использования исследуемого препарата, который содержит длинную версию человеческой последовательности HDR (AAVrh79.hHDR.TBG.hOTCco.bGH), в этом исследовании будет использоваться донорный вектор hOTCco, который содержит мышино-человеческую гибридную последовательность HDR (AAVrh79.mhHDR.TBG.hOTCco.bGH). Это вектор будет производиться сравнимым способом с партией вектора для оценки токсикологии клинического кандидата.

Мы выбрали мышино-человеческая гибридная последовательность HDR в донорном векторе (AAVrh79.mhHDR.TBG.hOTCco.bGH) для этого исследования, чтобы сделать возможным эффективное исследование фармакологии этого подхода, где донорная последовательность является непосредственно гомологичной последовательности у мышей PCSK9-hE7-KI.spf^{ash}.

В этом исследовании будут оценивать N=60 новорожденных (PND 1-2) мышей PCSK9-hE7-KI.spf^{ash} и N=15 совпадающих по возрасту самцов PCSK9-hE7-KI.WT (дикий тип) в качестве контроля. Исследование будет включать один момент времени проведения вскрытия (90 дней). Для оценки эффективности мышей будут стимулировать 10-дневной диетой с высоким содержанием белка от дня 81 до дня 90. Будут оценивать выживаемость, состояние организма и изменения биомаркеров. Будут оценивать три уровня доз AAV, используя в/в введение. Уровни доз будут выбирать на основании диапазона доз, оцениваемого в предыдущих клинических исследованиях. Оцениваемые уровни доз определять диапазон предполагаемых клинических доз.

Прижизненные оценки будут включать ежедневную проверку жизнеспособности, отслеживание выживаемости, измерения массы тела, оценку сывороточных уровней PCSK9, оценку уровней NH₃ в плазме и оротовой кислоты в моче после стимуляции диетой с высоким содержанием белка. Вскрытие будут проводить в день 90. При вскрытии будут брать кровь для ОАК/формулы с клинического химического анализа сыворотки. Для гистопатологической оценки будут получать перечень тканей. Будут извлекать печень для оценки нокина человеческого гена *OTC*, включая оценку экспрессии мРНК человеческого *OTC* (*in situ* гибридизация), экспрессии белка *OTC* (иммуоокрашивание) и активности фермента *OTC*, оцениваемой посредством окрашивания и/или анализа активности фермента. Также будут выделять печеночную

ДНК для оценки целевого редактирования (секвенирование ампликона) и оценки числа копий векторного генома.

МЭД будут определять на основании анализа выживаемости после диеты с высоким содержанием белка, плазменных уровней NH_3 в конце стимуляции диетой с высоким содержанием белка, экспрессии мРНК и белка человеческого *ОТС*, активности фермента *ОТС* и целевого редактирования AAV-обработанных новорожденных PCSK9-hE7-KI.spf^{ash} по сравнению с обработанными носителем новорожденными контрольными мышами PCSK9-hE7-KI.spf^{ash}.

ПРИМЕР 9 - ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИКОЛОГИИ У ДЕТЕНЬШЕЙ PCSK9-HE7-KI.SPF^{ASH}

6-месячное согласующееся с GLP исследование безопасности будут проводить на новорожденных (PND 1-2) мышах PCSK9-hE7-KI.spf^{ash} для исследования безопасности, переносимости, фармакологии и фармакокинетики исследуемого препарата после в/в совместного введения. Промежуточный анализ, включая целевое редактирование, нецелевое редактирование, экспрессию трансгена и гистопатологический анализ, будут проводить в день 60 и день 180, поскольку эти моменты времени обеспечат достаточное время для достижения для зависимой от нуклеазы вставки гена стабильного уровня плато после введения. Новорожденные мыши PCSK9-hE7-KI.spf^{ash} будут получать один из трех уровней доз исследуемого препарата ($1,0 \times 10^{12}$ ГК/кг нуклеазного вектора и $3,0 \times 10^{12}$ ГК/кг донорного вектора, $3,3 \times 10^{12}$ ГК/кг нуклеазного вектора и $1,0 \times 10^{13}$ ГК/кг донорного вектора или $1,0 \times 10^{13}$ ГК/кг нуклеазного вектора и $3,0 \times 10^{13}$ ГК/кг; N=20 на дозу) или носителя (фосфатно-солевой буферный раствор [ФСБ]; N=20). После введения исследуемого препарата или носителя прижизненные оценки будут включать клинический осмотр для ежедневного отслеживания признаков недомогания и аномального поведения, измерения массы тела и клиническую химию сыворотки крови (в частности, АЛТ, АСТ и общий билирубин).

В день 60 после введения исследуемого препарата когорты 1, 3, 5 и 7 будут умерщвлять и проводить гистопатологический анализ на исчерпывающем перечне тканей, включая, но не ограничиваясь этим, головной мозг, спинной мозг, сердце, печень, селезенку, почки, легкие, репродуктивные органы, надпочечники и лимфатические узлы. Органы будут взвешивать при необходимости.

Образцы печени будут получать и анализировать в отношении целевого редактирования посредством секвенирования ампликона и секвенирования АМР, нецелевого редактирования посредством секвенирования ИКП и секвенирования ампликона, биораспределения вектора и экспрессии трансгена. В образцах печени биораспределение будут оценивать посредством ПЦР, а экспрессию РНК мегануклеазы будут анализировать посредством проведения ОТ-ПЦР. Органы с высокой степенью перфузии будут анализировать в отношении РНК мегануклеазы, а ткани с выявляемой экспрессией РНК мегануклеазы будут оценивать в отношении целевого редактирования посредством секвенирования ампликона. Ткани с выявляемым целевым редактированием

будут дополнительно оценивать в отношении нецелевого редактирования.

Для биораспределения вектора разработают кПЦР-выявление, специфическое в отношении трансгенов двойных векторов, M2PCSK9 и hOTCso. Эффективность, линейность, точность, воспроизводимость и предел определения анализов будут оценивать, используя цис-плазмиды AAV в качестве суррогатов целевой последовательности. Нижний предел количественного определения (НПКО) анализов будут определять перед анализом на исследуемых тканях или выделениях. Будет реализован квалификационный план для соединения трансген-специфических анализов в квалификационными исследованиями, проведенными ранее. Исследуемая матрица будет включать предполагаемую мишень, печень для биораспределения. Эффект матрицы будут дополнительно оценивать на основании восстановления меченных целевых контролей из всех исследуемых образцов в курсе исследований биораспределения, а также данных полученных в квалификационных исследованиях, проведенных ранее.

ПРИМЕР 10 - НОКИН МИНИГЕНА hLDLR В ЛОКУСЕ PCSK9 С ПОМОЩЬЮ SACAS9 У ДЕТЕНЫШЕЙ PCSK9-hE7-KI.LDLR^{-/-}.APOBEC^{-/-} (МОДЕЛЬ HOFH)

Целью этого исследования является оценка, может ли опосредованный Cas9 нокин человеческого гена *LDLR* у новорожденных мышей *PCSK9-hE7-KI.ldlr/ldlr.apobec^{-/-}/apobec^{-/-}* обеспечить экспрессию терапевтического человеческого LDLR в целевой ткани для лечения семейной гиперхолестеринемии (печень) после однократного совместного введения экспрессирующего нуклеазу SaCas9 вектора и донорного вектора человеческого *LDLR* посредством предполагаемого клинического ПВ (в/в). Мышиную модель создавали, используя экспериментальный дизайн с Фиг. 15. В этой модели экзон 7 мышиногo PCSK9 замещен экзоном 7 человеческого PCSK9, который содержит нацеливающий последовательности SaCas9.

В день 0 новорожденным мышам *PCSK9-hE7-KI.ldlr/ldlr.apobec^{-/-}/apobec^{-/-}* в/в совместно вводили AAVrh79-вектор, экспрессирующий Cas9 (AAVrh79.U6.sgR3.PCSK9.APB2.HLP.SaCas9.bGH), в дозе $1,0 \times 10^{13}$ ГК/кг в комбинации с одним из двух разных донорных AAVrh79-векторов hLDLR в дозе $3,0 \times 10^{13}$ ГК/кг. Схема, иллюстрирующая используемые векторы, показана на Фиг. 16. В частности, один из донорных векторов, оцениваемых в этом исследовании, содержит мышино-человеческую гибридную последовательность HDR (AAVrh79.mhHDR.hLDLR011), а другой включал более короткую версию человеческой последовательности HDR (AAVrh79.shHDR.hLDLR011). В качестве отрицательного контроля дополнительным совпадающим по возрасту мышам *PCSK9-hE7-KI.spf^{ash}* вводили AAVrh79-вектор, не экспрессирующий saCas9, в комбинации с AAVrh79.shHDR.hLDLR011.

Прижизненные оценки включают проводимое ежедневно отслеживание жизнеспособности и оценку сывороточных уровней LDL-с в дни 42, 63, 90, 120 и 150. Частичную гепатэктомию проводят в день 63 для оценки стабильности трансдукции человеческого *LDLR*, а вскрытие - в день 150. При вскрытии извлекают печень для оценки

нокина человеческого гена *LDLR*, включая оценку экспрессии мРНК человеческого *LDLR* (*in situ* гибридизация), экспрессии белка *LDLR* (иммуноокрашивание). Печеночную ДНК выделяли для оценки целевого редактирования (секвенирование ампликона, Оксфордское нанопоровое секвенирование длинных ридов) и оценки числа копий векторного генома. Экспериментальный дизайн показан на Фиг. 17.

Предварительные результаты показывают, что мыши, которым вводили saCas9 и донорные векторы, имели существенно сниженные сывороточные уровни LDL. Изменений LDL после частичной 2/3 гепатэктомии не было, что указывает на стабильную интеграцию (Фиг. 18A). Количество инделов было сопоставимым при применении донорных векторов mhHDR и shHDR (Фиг. 18B). В день 63 shHDR-обработанные мыши демонстрировали немного более высокие уровни hLDLR (Фиг. 18C), тогда как сывороточные уровни LDL были сходными для векторов mhHDR и shHDR (с saCas9) (Фиг. 18D).

На Фиг. 19 проиллюстрирована иммуногистохимическая оценка экспрессии hLDLR в печени в день 63 после частичной гепатэктомии.

Все документы, цитируемые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки, как и последовательности и текст перечня последовательностей, поданного вместе с данным документом. Предварительные заявки на патент США №№ 63/180603, поданная 27 апреля 2021 г., 63/242474, поданная 9 сентября 2021 г., 63/244205, поданная 14 сентября 2021 г., 63/301933, поданная 21 января 2022 г., 63/331385, поданная 15 апреля 2022 г., в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Хотя изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, будет очевидно, что можно осуществлять модификации, не отступая от сущности изобретения. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|------------------------|
| 1 | <221> ДКП |
| 1 | <222> (1)..(168) |
| 1 | <223> ИКП AAV |
| | |
| 1 | <221> терминатор |
| 1 | <222> (193)..(199) |
| 1 | <223> терминатор U6 |
| | |
| 1 | <221> прочий_признак |
| 1 | <222> (199)..(275) |
| 1 | <223> каркас гРНК |
| | |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|------------------------------|
| 1 | <221> прочий_признак |
| 1 | <222> (276)..(295) |
| 1 | <223> оргРНК РССК9 |
| | |
| 1 | <221> промотор |
| 1 | <222> (297)..(545) |
| 1 | <223> промотор U6 |
| | |
| 1 | <221> энхансер |
| 1 | <222> (557)..(656) |
| 1 | <223> энхансер альфа mic/bik |
| | |
| 1 | <221> энхансер |
| 1 | <222> (663)..(762) |
| 1 | <223> энхансер альфа mic/bik |
| | |
| 1 | <221> промотор |
| 1 | <222> (777)..(952) |
| 1 | <223> ТВG-S1 |
| | |
| 1 | <221> прочий_признак |
| 1 | <222> (956)..(958) |
| 1 | <223> мутация стоп-кодона |
| | |
| 1 | <221> прочий_признак |
| 1 | <222> (973)..(1017) |
| 1 | <223> СЯЛ SV40 |
| | |
| 1 | <221> праймер_связ. |
| 1 | <222> (1160)..(1179) |
| 1 | <223> SA2-посл. 1 |
| | |
| 1 | <221> праймер_связ. |
| 1 | <222> (1647)..(1666) |
| 1 | <223> SA2-посл. 2 |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|------------------------|
| 1 | <221> праймер_связ. |
| 1 | <222> (2170)..(2189) |
| 1 | <223> SA2-посл. 3 |
| 1 | <221> праймер_связ. |
| 1 | <222> (2680)..(2700) |
| 1 | <223> SA2-посл. 4 |
| 1 | <221> праймер_связ. |
| 1 | <222> (3130)..(3149) |
| 1 | <223> SA2-посл. 5 |
| 1 | <221> прочий_признак |
| 1 | <222> (4174)..(4221) |
| 1 | <223> СЯЛ |
| 1 | <221> сигнал_полиА |
| 1 | <222> (4233)..(4435) |
| 1 | <223> поли А bGH |
| 1 | <221> ДКП |
| 1 | <222> (4456)..(4619) |
| 1 | <223> ИКП АAV |
| 1 | <221> прочий_признак |
| 1 | <222> (5382)..(6239) |
| 1 | <223> Amp-R |
| 1 | <221> прочий_признак |
| 1 | <222> (6413)..(7001) |
| 1 | <223> Источник |
| 2 | <221> ДКП |
| 2 | <222> (1)..(168) |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|------------------------------|
| 2 | <223> ИКП ААV |
| | |
| 2 | <221> терминатор |
| 2 | <222> (193)..(199) |
| 2 | <223> терминатор U6 |
| | |
| 2 | <221> прочий_признак |
| 2 | <222> (199)..(275) |
| 2 | <223> каркас кшРНК |
| | |
| 2 | <221> прочий_признак |
| 2 | <222> (276)..(295) |
| 2 | <223> орРНК РССК9 |
| | |
| 2 | <221> промотор |
| 2 | <222> (297)..(545) |
| 2 | <223> промотор U6 |
| | |
| 2 | <221> энхансер |
| 2 | <222> (557)..(656) |
| 2 | <223> энхансер альфа mic/bik |
| | |
| 2 | <221> энхансер |
| 2 | <222> (663)..(762) |
| 2 | <223> энхансер альфа mic/bik |
| | |
| 2 | <221> промотор |
| 2 | <222> (777)..(952) |
| 2 | <223> TBG-S1 |
| | |
| 2 | <221> прочий_признак |
| 2 | <222> (956)..(958) |
| 2 | <223> мутация стоп-кодона |
| | |
| 2 | <221> CDS |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|---------------------------|
| 2 | <222> (967)..(4221) |
| 2 | <223> SaCas9 (рх601+3СЯЛ) |
| | |
| 2 | <221> прочий_признак |
| 2 | <222> (973)..(1017) |
| 2 | <223> СЯЛ SV40 |
| | |
| 2 | <221> праймер_связ. |
| 2 | <222> (1160)..(1179) |
| 2 | <223> Sa2-посл. 1 |
| | |
| 2 | <221> праймер_связ. |
| 2 | <222> (1647)..(1666) |
| 2 | <223> Sa2-посл. 2 |
| | |
| 2 | <221> праймер_связ. |
| 2 | <222> (2170)..(2189) |
| 2 | <223> Sa2-посл. 3 |
| | |
| 2 | <221> праймер_связ. |
| 2 | <222> (2680)..(2700) |
| 2 | <223> Sa2-посл. 4 |
| | |
| 2 | <221> праймер_связ. |
| 2 | <222> (3130)..(3149) |
| 2 | <223> Sa2-посл. 5 |
| | |
| 2 | <221> прочий_признак |
| 2 | <222> (4174)..(4221) |
| 2 | <223> СЯЛ |
| | |
| 2 | <221> сигнал_полиА |
| 2 | <222> (4233)..(4435) |
| 2 | <223> поли А bGH |
| | |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|--|
| 2 | <221> ДКП |
| 2 | <222> (4456)..(4619) |
| 2 | <223> ИКП ААV |
| | |
| 3 | <213> Искусственная последовательность |
| 3 | <223> Синтетическая конструкция |
| | |
| 4 | <221> ДКП |
| 4 | <222> (1)..(168) |
| 4 | <223> ИКП ААV |
| | |
| 4 | <221> терминатор |
| 4 | <222> (193)..(199) |
| 4 | <223> терминатор U6 |
| | |
| 4 | <221> прочий_признак |
| 4 | <222> (199)..(275) |
| 4 | <223> каркас гРНК |
| | |
| 4 | <221> прочий_признак |
| 4 | <222> (276)..(295) |
| 4 | <223> огРНК PCSK9 |
| | |
| 4 | <221> промотор |
| 4 | <222> (297)..(545) |
| 4 | <223> промотор U6 |
| | |
| 4 | <221> энхансер |
| 4 | <222> (557)..(656) |
| 4 | <223> энхансер альфа mic/bik |
| | |
| 4 | <221> энхансер |
| 4 | <222> (663)..(762) |
| 4 | <223> альфа mic/bik |
| | |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|---------------------------|
| 4 | <221> промотор |
| 4 | <222> (777)..(1027) |
| 4 | <223> HLP |
| | |
| 4 | <221> прочий_признак |
| 4 | <222> (1034)..(4288) |
| 4 | <223> SaCas9 (px601+3СЯЛ) |
| | |
| 4 | <221> прочий_признак |
| 4 | <222> (1040)..(1084) |
| 4 | <223> СЯЛ SV40 |
| | |
| 4 | <221> праймер_связ. |
| 4 | <222> (1227)..(1246) |
| 4 | <223> Sa2-посл. 1 |
| | |
| 4 | <221> праймер_связ. |
| 4 | <222> (1714)..(1733) |
| 4 | <223> Sa2-посл.2 |
| | |
| 4 | <221> праймер_связ. |
| 4 | <222> (2237)..(2256) |
| 4 | <223> Sa2-посл. 3 |
| | |
| 4 | <221> праймер_связ. |
| 4 | <222> (2747)..(2767) |
| 4 | <223> Sa2-посл. 4 |
| | |
| 4 | <221> праймер_связ. |
| 4 | <222> (3197)..(3216) |
| 4 | <223> Sa2-посл. 5 |
| | |
| 4 | <221> прочий_признак |
| 4 | <222> (4241)..(4288) |
| 4 | <223> СЯЛ |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|------------------------|
| 4 | <221> ДКП |
| 4 | <222> (4253)..(4686) |
| 4 | <223> ИКП ААV |
| 4 | <221> сигнал_полиА |
| 4 | <222> (4300)..(4502) |
| 4 | <223> bGH |
| 4 | <221> прочий_признак |
| 4 | <222> (5449)..(6306) |
| 4 | <223> Amp-R |
| 4 | <221> прочий_признак |
| 4 | <222> (6480)..(7068) |
| 4 | <223> Источник |
| 5 | <221> ДКП |
| 5 | <222> (1)..(168) |
| 5 | <223> ИКП ААV |
| 5 | <221> терминатор |
| 5 | <222> (193)..(199) |
| 5 | <223> терминатор U6 |
| 5 | <221> прочий_признак |
| 5 | <222> (199)..(275) |
| 5 | <223> каркас гРНК |
| 5 | <221> прочий_признак |
| 5 | <222> (276)..(295) |
| 5 | <223> орРНК PCSK9 |
| 5 | <221> промотор |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|------------------------------|
| 5 | <222> (297)..(545) |
| 5 | <223> промотор U6 |
| | |
| 5 | <221> энхансер |
| 5 | <222> (557)..(656) |
| 5 | <223> энхансер альфа mic/bik |
| | |
| 5 | <221> энхансер |
| 5 | <222> (663)..(762) |
| 5 | <223> энхансер альфа mic/bik |
| | |
| 5 | <221> промотор |
| 5 | <222> (777)..(1027) |
| 5 | <223> HLP |
| | |
| 5 | <221> CDS |
| 5 | <222> (1034)..(4288) |
| 5 | <223> SaCas9 (px601+3СЯЛ) |
| | |
| 5 | <221> прочий_признак |
| 5 | <222> (1040)..(1084) |
| 5 | <223> СЯЛ SV40 |
| | |
| 5 | <221> праймер_связ. |
| 5 | <222> (1227)..(1246) |
| 5 | <223> Sa2-посл. 1 |
| | |
| 5 | <221> праймер_связ. |
| 5 | <222> (1714)..(1733) |
| 5 | <223> Sa2-посл.2 |
| | |
| 5 | <221> праймер_связ. |
| 5 | <222> (2237)..(2256) |
| 5 | <223> Sa2-посл. 3 |
| | |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|---|
| 5 | <221> праймер_связ. |
| 5 | <222> (2747)..(2767) |
| 5 | <223> Sa2-посл. 4 |
| | |
| 5 | <221> праймер_связ. |
| 5 | <222> (3197)..(3216) |
| 5 | <223> Sa2-посл. 5 |
| | |
| 5 | <221> прочий_признак |
| 5 | <222> (4241)..(4288) |
| 5 | <223> СЯЛ |
| | |
| 5 | <221> ДКП |
| 5 | <222> (4253)..(4686) |
| 5 | <223> ИКП АAV |
| | |
| 5 | <221> сигнал_полиА |
| 5 | <222> (4300)..(4502) |
| 5 | <223> поли А bGH |
| | |
| 6 | <213> Искусственная последовательность |
| 6 | <223> Синтетическая конструкция |
| | |
| 7 | <213> Искусственная последовательность |
| 7 | <223> последовательность нуклеиновой кислоты SaCas9 (pX601+3СЯЛ) |
| | |
| 8 | <213> Искусственная последовательность |
| 8 | <223> орРНК PCSK9 |
| | |
| 9 | <213> Искусственная последовательность |
| 9 | <223> каркас орРНК |
| | |
| 10 | <213> Искусственная последовательность |
| 10 | <223> промотор U6 |
| | |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|--|
| 11 | <213> Искусственная последовательность |
| 11 | <223> промотор TBG-S1 |
| | |
| 12 | <213> Искусственная последовательность |
| 12 | <223> промотор HLP |
| | |
| 13 | <213> Искусственная последовательность |
| 13 | <223> геномная последовательность rhPCSK9 - последовательность нуклеиновой кислоты экзона 7 |
| | |
| 13 | <221> прочий_признак |
| 13 | <222> (214)..(397) |
| 13 | <223> экзон 7 |
| | |
| 13 | <221> прочий_признак |
| 13 | <222> (256)..(261) |
| 13 | <223> PAM (SaCas9) |
| | |
| 13 | <221> прочая_РНК |
| 13 | <222> (262)..(281) |
| 13 | <223> орРНК-SaCas9 |
| | |
| 13 | <221> прочий_признак |
| 13 | <222> (293)..(314) |
| 13 | <223> последовательность нацеливания PCS 7-8 |
| | |
| 13 | <221> прочий_признак |
| 13 | <222> (305)..(306) |
| 13 | <223> Сайт разрезания мегануклеазой |
| | |
| 14 | <213> Искусственная последовательность |
| 14 | <223> вырабатывающая плаزمида TBG.hOTCco2.G4SVPA.LB |
| | |
| 14 | <221> область_повтора |
| 14 | <222> (1)..(105) |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|------------------------|
| 14 | <223> ITR |
| | |
| 14 | <221> промотор |
| 14 | <222> (164)..(880) |
| 14 | <223> промотор TBG |
| | |
| 14 | <221> энхансер |
| 14 | <222> (183)..(282) |
| 14 | <223> энхансер |
| | |
| 14 | <221> сигнал_ТАТА |
| 14 | <222> (847)..(850) |
| 14 | <223> сигнал ТАТА |
| | |
| 14 | <221> прочий_признак |
| 14 | <222> (972)..(2039) |
| 14 | <223> hOTCco2 |
| | |
| 14 | <221> сигнал_полиА |
| 14 | <222> (2042)..(2178) |
| 14 | <223> G4SVPA |
| | |
| 14 | <221> область_повтора |
| 14 | <222> (2207)..(2374) |
| 14 | <223> ITR |
| | |
| 14 | <221> прочий_признак |
| 14 | <222> (3898)..(5700) |
| 14 | <223> tmp1 |
| | |
| 14 | <221> прочий_признак |
| 14 | <222> (6866)..(7726) |
| 14 | <223> Amp-R |
| | |
| 14 | <221> прочий_признак |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|---|
| 14 | <222> (7897)..(8485) |
| 14 | <223> Источник |
| | |
| 15 | <213> Искусственная последовательность |
| 15 | <223> векторный геном TBG.hOTCco2.G4SVPA.LB |
| | |
| 15 | <221> область_повтора |
| 15 | <222> (1)..(105) |
| 15 | <223> ITR |
| | |
| 15 | <221> промотор |
| 15 | <222> (164)..(880) |
| 15 | <223> промотор TBG |
| | |
| 15 | <221> энхансер |
| 15 | <222> (183)..(282) |
| 15 | <223> энхансер |
| | |
| 15 | <221> сигнал_ТАТА |
| 15 | <222> (847)..(850) |
| 15 | <223> ТАТА |
| | |
| 15 | <221> CDS |
| 15 | <222> (972)..(2039) |
| 15 | <223> hOTCco2 |
| | |
| 15 | <221> сигнал_полиА |
| 15 | <222> (2042)..(2178) |
| 15 | <223> G4SVPA |
| | |
| 15 | <221> область_повтора |
| 15 | <222> (2207)..(2374) |
| 15 | <223> ITR |
| | |
| 16 | <213> Искусственная последовательность |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|--|
| 16 | <223> Синтетическая конструкция |
| 17 | <213> Искусственная последовательность |
| 17 | <223> сконструированная последовательность нуклеиновой кислоты hOTCco2 |
| 18 | <213> Искусственная последовательность |
| 18 | <223> вырабатывающая плазмида TBG-S1-F113.PCS7-8L.197.bGH |
| 18 | <221> область_повтора |
| 18 | <222> (1)..(168) |
| 18 | <223> ITR |
| 18 | <221> промотор |
| 18 | <222> (206)..(318) |
| 18 | <223> промотор TBG S1 |
| 18 | <221> прочий_признак |
| 18 | <222> (330)..(1424) |
| 18 | <223> PCS7-8L |
| 18 | <221> сигнал_полиА |
| 18 | <222> (1435)..(1649) |
| 18 | <223> сигнал поли А bGH |
| 18 | <221> область_повтора |
| 18 | <222> (1699)..(1866) |
| 18 | <223> ITR |
| 18 | <221> прочий_признак |
| 18 | <222> (2629)..(3486) |
| 18 | <223> Amp-R |
| 18 | <221> прочий_признак |
| 18 | <222> (3660)..(4248) |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|--|
| 18 | <223> Источник |
| 19 | <213> Искусственная последовательность |
| 19 | <223> векторный геном TBG-S1-F113.PCS7-8L.197.bGH |
| 19 | <221> область_повтора |
| 19 | <222> (1)..(168) |
| 19 | <223> ITR |
| 19 | <221> промотор |
| 19 | <222> (206)..(318) |
| 19 | <223> TBG S1 |
| 19 | <221> CDS |
| 19 | <222> (330)..(1424) |
| 19 | <223> PCS7-8L |
| 19 | <221> сигнал_полиА |
| 19 | <222> (1435)..(1649) |
| 19 | <223> поли А bGH |
| 19 | <221> область_повтора |
| 19 | <222> (1691)..(1736) |
| 19 | <223> ITR |
| 20 | <213> Искусственная последовательность |
| 20 | <223> Синтетическая конструкция |
| 21 | <213> Искусственная последовательность |
| 21 | <223> последовательность нуклеиновой кислоты PCS7-8L |
| 22 | <221> CDS |
| 22 | <223> CDS PCSK9 |
| 30 | <221> прочий_признак |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|--|
| 30 | <223> CDS для hOTC |
| | |
| 31 | <213> Искусственная последовательность |
| 31 | <223> мотив CRE |
| | |
| 32 | <213> Искусственная последовательность |
| 32 | <223> последовательность распознавания CRE |
| | |
| 41 | <221> прочий_признак |
| 41 | <223> промотор TBG |
| | |
| 42 | <213> Искусственная последовательность |
| 42 | <223> Сконструированная последовательность |
| | |
| 42 | <221> область_повтора |
| 42 | <222> (1)..(130) |
| 42 | <223> 5' ИКП |
| | |
| 42 | <221> промотор |
| 42 | <222> (211)..(907) |
| 42 | <223> TBG с энхансером |
| | |
| 42 | <221> промотор |
| 42 | <222> (211)..(310) |
| 42 | <223> энхансер альфа mic/bik |
| | |
| 42 | <221> промотор |
| 42 | <222> (317)..(419) |
| 42 | <223> энхансер альфа mic/bik |
| | |
| 42 | <221> промотор |
| 42 | <222> (474)..(907) |
| 42 | <223> промотор TBG |
| | |
| 42 | <221> Интрон |
| 42 | <222> (939)..(1071) |

| SEQ ID NO: | Информация по признаку |
|------------|--|
| 42 | <221> CDS |
| 42 | <222> (1089)..(2183) |
| 42 | <223> ARCUS |
| 42 | <221> прочий_признак |
| 42 | <222> (2022)..(2743) |
| 42 | <223> WPRE |
| 42 | <221> сигнал_полиА |
| 42 | <222> (2750)..(2964) |
| 42 | <223> поли А BGH |
| 42 | <221> область_повтора |
| 42 | <222> (3052)..(3181) |
| 42 | <223> 3' ИКП |
| 43 | <213> Искусственная последовательность |
| 43 | <223> Синтетическая конструкция |
| 44 | <221> прочий_признак |
| 44 | <223> последовательность нацеливания ARCUS |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система для лечения генетического нарушения, содержащая:
 - (a) вектор для редактирования генов, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, нацеленную на ген PCSK9; и
 - (b) донорный вектор, содержащий трансгенную кассету, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансген, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, при этом донорный вектор дополнительно содержит плечи обусловленной гомологией рекомбинации (HDR) 5' и 3' относительно трансгенной кассеты, при этом трансген не представляет собой PCSK9.
2. Система по п. 1, дополнительно содержащая регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, при этом клетка-мишень содержит ген PCSK9.
3. Система по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что нуклеаза нацелена на экзон 7 PCSK9.
4. Система по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что нуклеаза представляет собой мегануклеазу, специфическую в отношении PCSK9.
5. Система по п. 4, отличающаяся тем, что мегануклеаза представляет собой мегануклеазу ARCUS.
6. Система по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что вектор для редактирования генов содержит последовательность, которая кодирует Cas9, фланкируемую сигналами ядерной локализации.
7. Система по п. 6, отличающаяся тем, что вектор для редактирования генов дополнительно содержит огРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которая специфически связывается с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9.
8. Система по п. 6, отличающаяся тем, что донорный вектор дополнительно содержит огРНК, содержащую затравочную область из по меньшей мере 20 нуклеотидов, при этом огРНК специфически связывается с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9.
9. Система по любому из пп. 6-8, дополнительно содержащая промотор РНК-полимеразы.
10. Система по п. 9, отличающаяся тем, что промотор РНК-полимеразы представляет собой промотор U6.
11. Система по п. 10, отличающаяся тем, что промотор U6 расположен 5' относительно огРНК.
12. Система по любому из пп. 7-11, отличающаяся тем, что затравочная область является на 100% комплементарной последовательности сайта-мишени.

13. Система по любому из пп. 7-11, отличающаяся тем, что затравочная область является менее чем на 100% комплементарной последовательности сайта-мишени.

14. Система по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что трансген представляет собой OTC, PKU, CTLN1 или LDLR.

15. Система по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из донорного вектора и вектора для редактирования генов представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор, и при этом AAV-вектор содержит 5' ИКП AAV и 3' ИКП AAV.

16. Система по п. 15, отличающаяся тем, что соотношение AAV-вектора для редактирования генов по (а) и донорного AAV-вектора по (б) является таким, что донорный AAV-вектор по (б) находится в избытке по сравнению с вектором для редактирования генов по (а).

17. Система для лечения генетического нарушения, содержащая:

(а) AAV для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный геном, содержащий 5' ИКП, последовательность, кодирующую мегануклеазу, нацеленную на PCSK9, под контролем регуляторных последовательностей, которые управляют экспрессией мегануклеазы в клетке-хозяине, содержащей ген PCSK9, и 3' ИКП; и

(б) донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-хозяине, 3' плечо HDR и 3' ИКП.

18. Система для лечения генетического нарушения, содержащая:

(а) AAV для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный геном, содержащий 5' ИКП, 5' сигнал ядерной локализации (СЯЛ), последовательность, кодирующую Cas9, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией saCas9 в клетке-хозяине, содержащей ген PCSK9, 3' СЯЛ и 3' ИКП; и

(б) донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-хозяине, 3' плечо HDR, промотор U6, оgРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (РАМ), который специфически распознается Cas9, и 3' ИКП.

19. Система для лечения генетического нарушения, содержащая:

(а) AAV-вектор для редактирования генов, содержащий капсид AAV и первый векторный геном, содержащий 5' ИКП, промотор U6, оgРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (РАМ), который специфически распознается Cas9, 5' сигнал ядерной локализации (СЯЛ), последовательность, кодирующую Cas9, и регуляторные

последовательности, которые управляют экспрессией Cas9 в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9, 3' СЯЛ и 3' ИКП;

(b) донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-хозяине, 3' плечо HDR и 3' ИКП.

20. Система для лечения генетического нарушения, содержащая:

(a) вектор для редактирования генов, содержащий:

(i) липидную наночастицу;

(ii) огРНК, содержащую по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9;

(iii) мРНК, содержащую 5' сигнал ядерной локализации (СЯЛ), последовательность, кодирующую Cas9, 3' СЯЛ; и

(b) донорный AAV-вектор, содержащий капсид AAV и второй векторный геном, содержащий: 5' ИКП, 5' плечо обусловленной гомологией рекомбинации (HDR), трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-хозяине, 3' плечо HDR и 3' ИКП.

21. Система по любому из пп. 17-19, отличающаяся тем, что AAV-вектор для редактирования генов по (a) и донорный AAV-вектор по (b) имеют одинаковый капсид AAV.

22. Система по п. 21, отличающаяся тем, что капсид AAV выбран из AAV8, AAV9, rh10, AAV6.2, AAV3B, hu37, rh79 и rh64.

23. Система по любому из пп. 6-18 или 18-22, отличающаяся тем, что Cas9 выбран из Cas9 *Staphylococcus aureus* или *Streptococcus pyogenes*.

24. Система по любому из пп. 2-19, отличающаяся тем, что нуклеаза находится под контролем тканеспецифического промотора.

25. Система по любому из пп. 2-19, отличающаяся тем, что нуклеаза находится под контролем конститутивного промотора.

26. Система по п. 24, отличающаяся тем, что нуклеаза находится под контролем печеночно-специфического промотора, необязательно, промотора человеческого тироксин-связывающего глобулина (ТВГ) или гибридного печеночного промотора (HLP).

27. Способ лечения нарушения у людей путем совместного введения системы по любому из пп. 1-26.

28. Способ лечения метаболического нарушения со стороны печени у новорожденного субъекта, включающий совместное введение субъекту, имеющему метаболическое нарушение со стороны печени:

(a) AAV-вектора для редактирования генов, содержащую последовательность, кодирующую нуклеазу, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией нуклеазы в клетке-мишени, содержащей ген PCSK9; и

(b) донорного AAV-вектора, содержащего трансген и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией трансгена в клетке-мишени, при этом донорный вектор дополнительно содержит плечи обусловленной гомологией рекомбинации (HDR) 5' и 3' относительно трансгенной кассеты.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что AAV-вектор для редактирования генов по (a) и донорный вектор по (b) доставляют практически одновременно и одним путем.

30. Способ по п. 28 или 29, отличающийся тем, что AAV-вектор для редактирования генов по (a) суспендирован в носителе для инъекции в концентрации от около 2×10^{11} ГК/мл до около 2×10^{12} ГК/мл.

31. Способ по п. 28 или 29, отличающийся тем, что нацеливающий AAV-вектор по (a) суспендирован в носителе для инъекции в концентрации от около 2×10^{12} ГК/мл до около 1×10^{13} ГК/мл.

32. Способ по любому из пп. 28-31, отличающийся тем, что метаболическое нарушение со стороны печени представляет собой дефицит орнитинтранскарбамилазы.

33. Способ по любому из пп. 28-31, отличающийся тем, что метаболическое нарушение со стороны печени представляет собой ОТС, FH, цитруллинемию типа I (CTLN1) или фенилкетонурия.

34. Система для лечения генетических нарушений, содержащая:

(a) липидную наночастицу (ЛНЧ), содержащую последовательность мРНК, кодирующую нуклеазу; и

(b) донорный AAV-вектор, содержащий трансген и регуляторные последовательности, которые управляют его экспрессией в клетке-мишени, при этом донорный вектор дополнительно содержит плечи обусловленной гомологией рекомбинации (HDR) 5' и 3' относительно трансгена.

35. Система по п. 34, отличающаяся тем, что нуклеаза нацелена на ген PCSK9.

36. Система по п. 34, отличающаяся тем, что нуклеаза нацелена на экзон 7 PCSK9.

37. Система по п. 34, отличающаяся тем, что нуклеаза представляет собой мегануклеазу, специфическую в отношении PCSK9.

38. Система по п. 37, отличающаяся тем, что мегануклеаза представляет собой мегануклеазу ARCUS.

39. Система по п. 34, отличающаяся тем, что нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, и при этом указанная ЛНЧ содержит огРНК.

40. Система по п. 39, отличающаяся тем, что нуклеаза Cas9 фланкируется сигналами ядерной локализации.

41. Система по п. 39 или 40, отличающаяся тем, что огРНК содержит по меньшей мере 20 нуклеотидов, которые специфически связываются с сайтом-мишенью в гене

PCSK9, при этом указанный сайт-мишень расположен 5' относительно прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), который специфически распознается Cas9.

42. Система по любому из пп. 34-41, дополнительно содержащая промотор РНК-полимеразы.

43. Система по п. 43, отличающаяся тем, что промотор РНК-полимеразы представляет собой промотор U6.

44. Система по п. 46, отличающаяся тем, что промотор U6 расположен 5' относительно оgРНК.

45. Система по любому из пп. 34-44, отличающаяся тем, что оgРНК является на 100% комплементарной последовательности сайта-мишени.

46. Система по любому из пп. 34-44, отличающаяся тем, что оgРНК является менее чем на 100% комплементарной последовательности сайта-мишени.

47. Система по любому из пп. 34-46, отличающаяся тем, что трансген представляет собой экспрессируемый в печени ген.

48. Система по любому из пп. 34-47, отличающаяся тем, что трансген выбран из ОТС, РКU, CTLN1 и FH.

49. Система для лечения генетического нарушения, содержащая:

(a) вектор для редактирования генов, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу; и

(b) донорный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный продукт для экспрессии из локуса PCSK9, при этом вставленная последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует PCSK9,

при этом система дополнительно содержит последовательности, которые направляют нуклеазу для специфического нацеливания на локус нативного гена PCSK9; и

при этом после введения двойной векторной системы происходит необязательная абляция или уменьшение количества нативного PCSK9 в клетке-мишени.

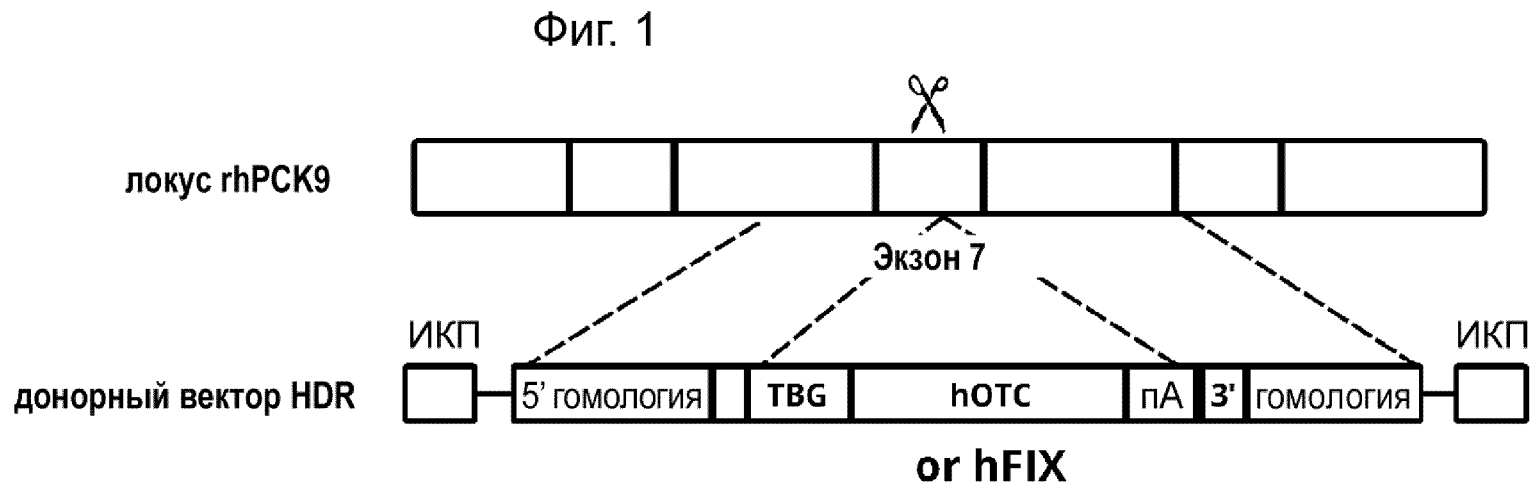
50. Способ лечения пациента с использованием системы по п. 49, отличающийся тем, что уровни экспрессии нативного PCSK9 у пациента снижаются, и при этом пациент экспрессирует экзогенный продукт.

51. Экспрессионная кассета, содержащая сконструированную кодирующую последовательность с SEQ ID NO: 17, или последовательности, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с ней.

52. Экспрессионная кассета по п. 51, дополнительно содержащая 5' и 3' ИКП AAV.

53. AAV-вектор, содержащий экспрессионную кассету по п. 51 или 52.

По доверенности



Новорожденные
или 3-месячные



Инъекция AAVhu37



День

0

7

14

28

42

56

70

84

сбор крови, ~ каждые 2-4 недели

(химия сыворотки/CBC, эксп. hFIX в плазме, PCSK9 в сыворотке, липиды, NAb)

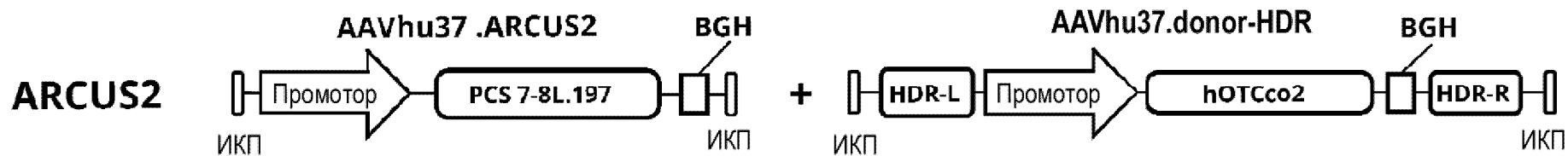
Фиг. 2

Векторный геном, генная экспрессия, целевое/
нецелевое редактирование, гистология

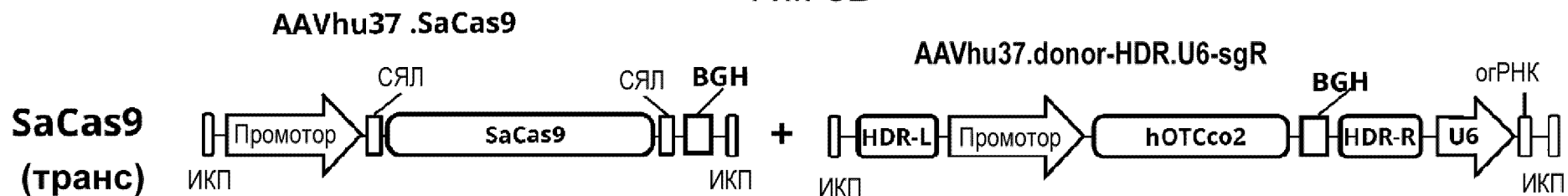
1-ая биопсия
печени

2-ая биопсия
печени

Фиг. 3А

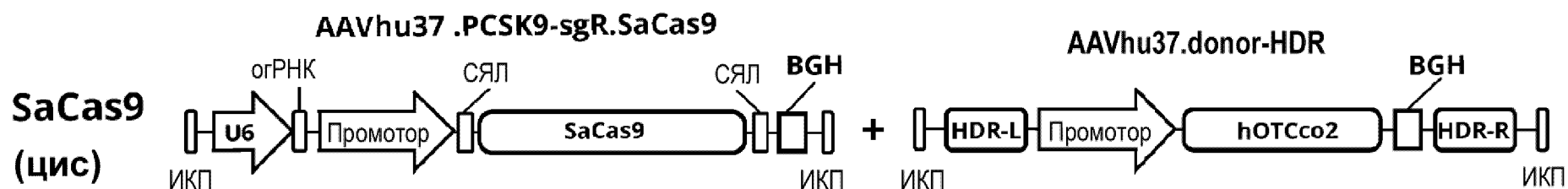


Фиг. 3В

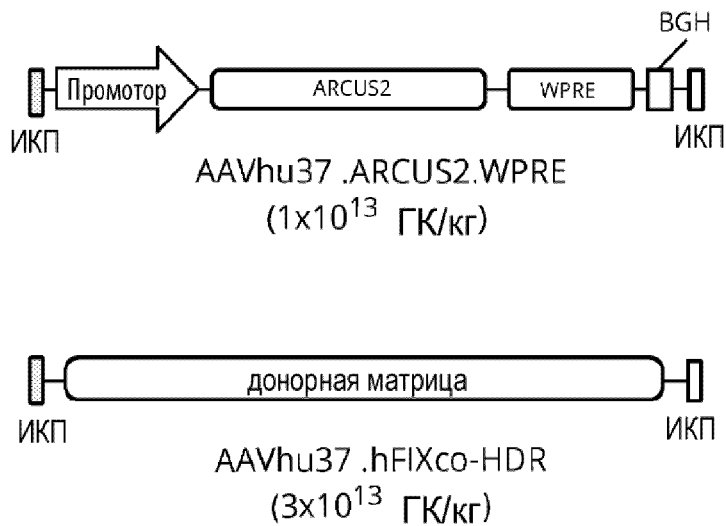
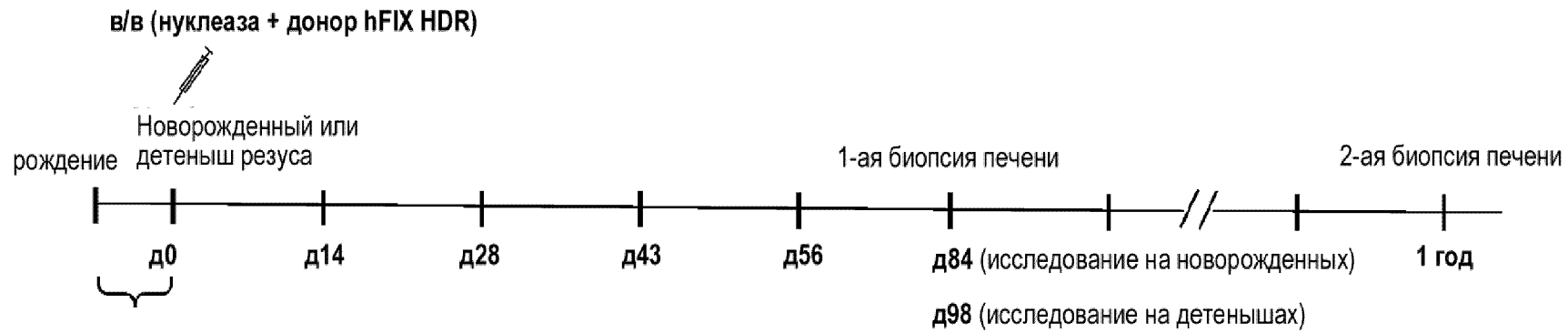


2/43

Фиг. 3С

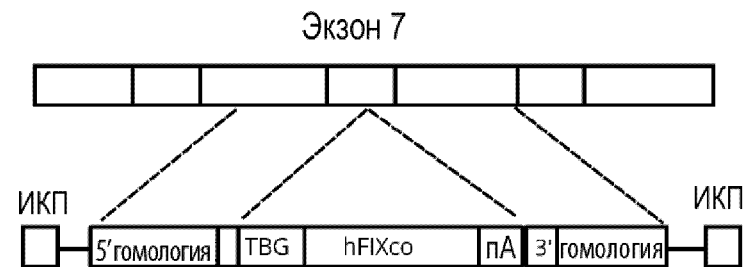


Фиг. 4А

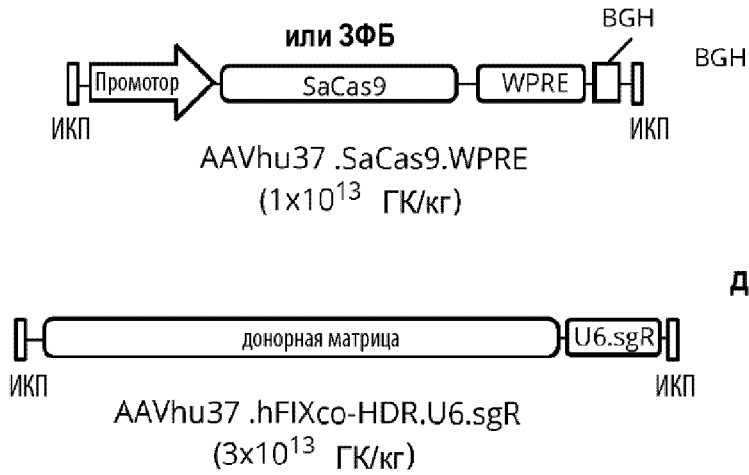
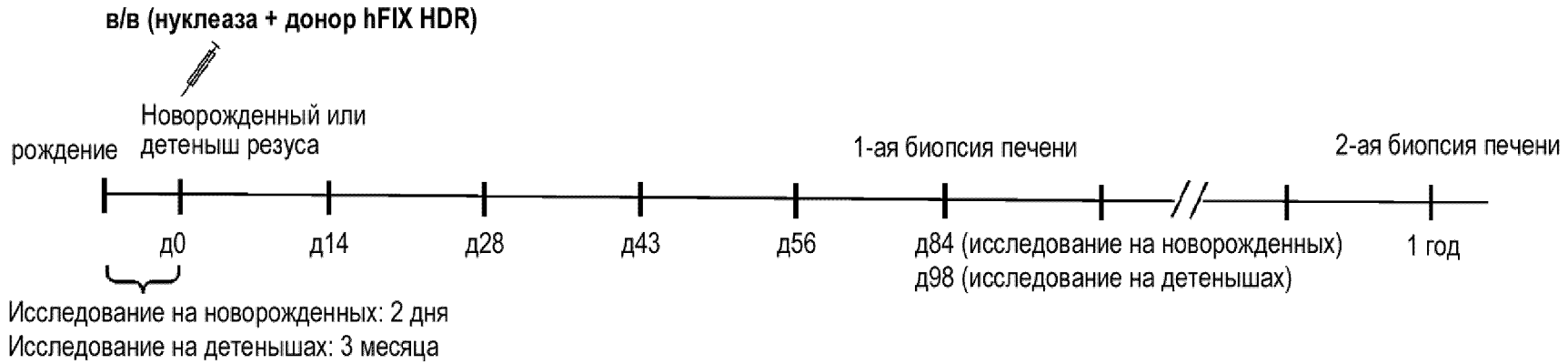


локус hPCSK9

донорный вектор HDR

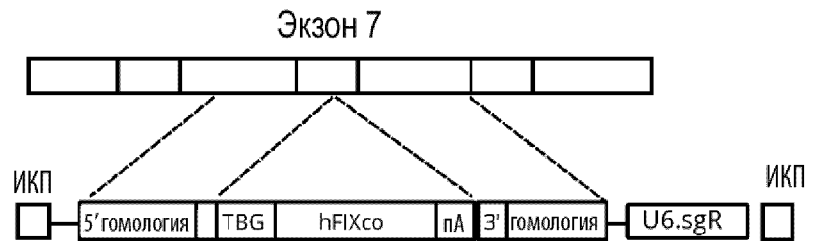


Фиг. 4В

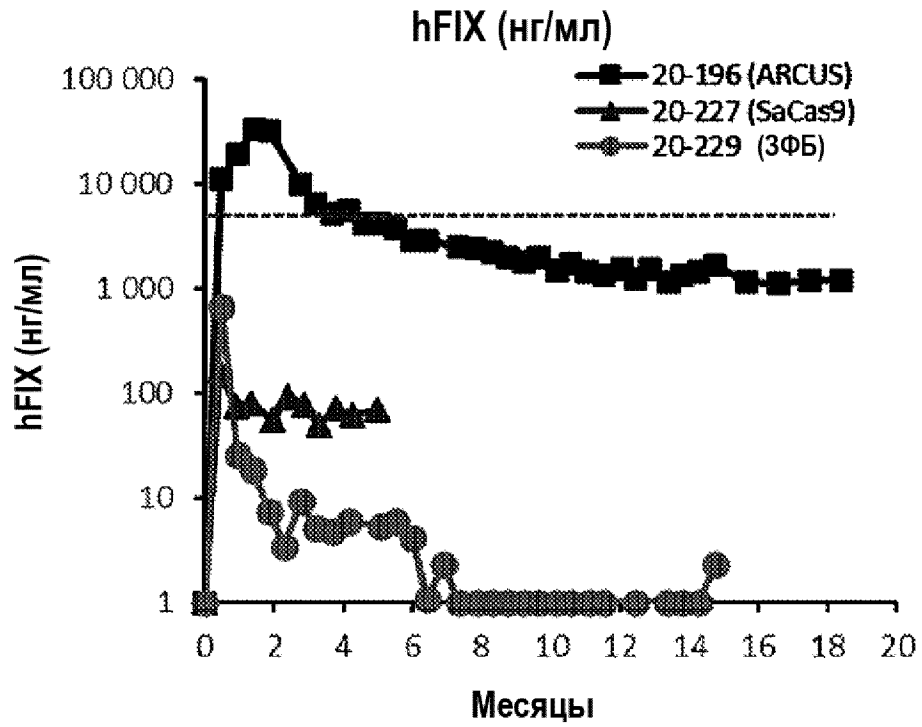


локус hPCSK9

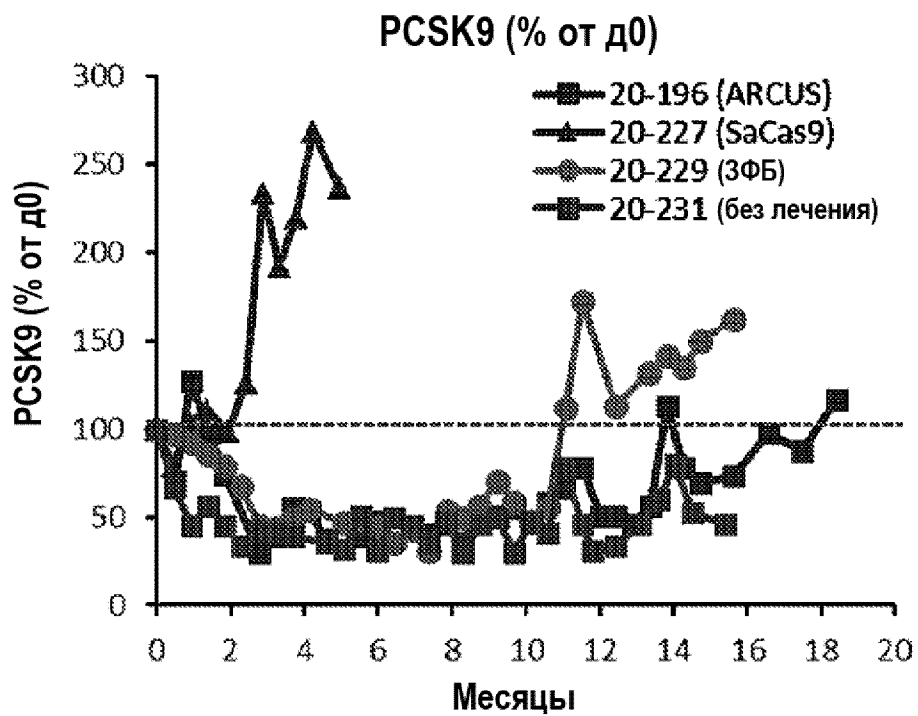
донорный вектор HDR



Фиг. 4С



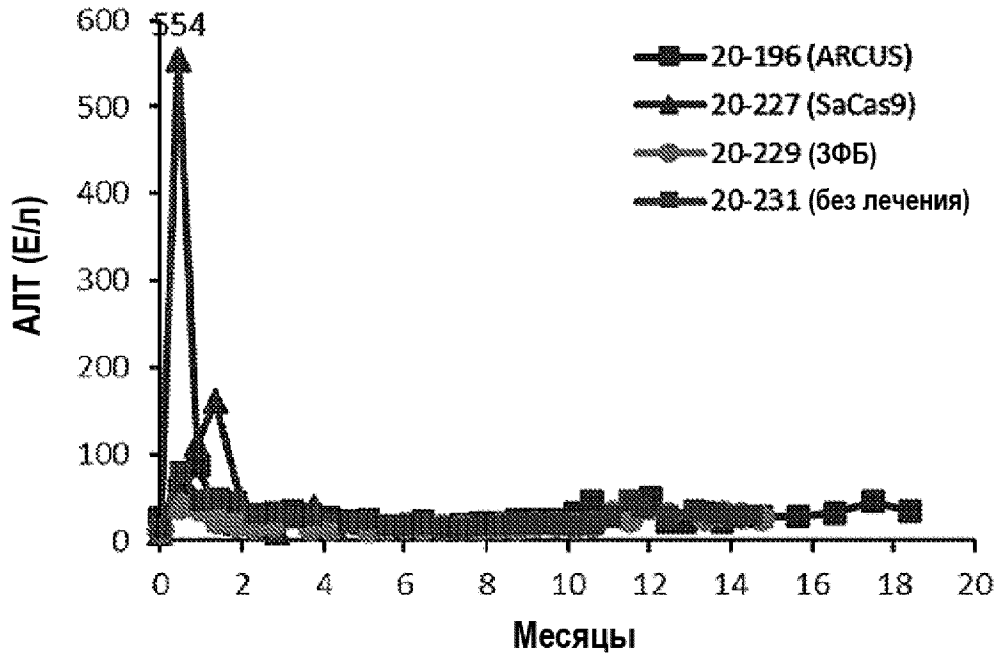
Фиг. 4D



6/43

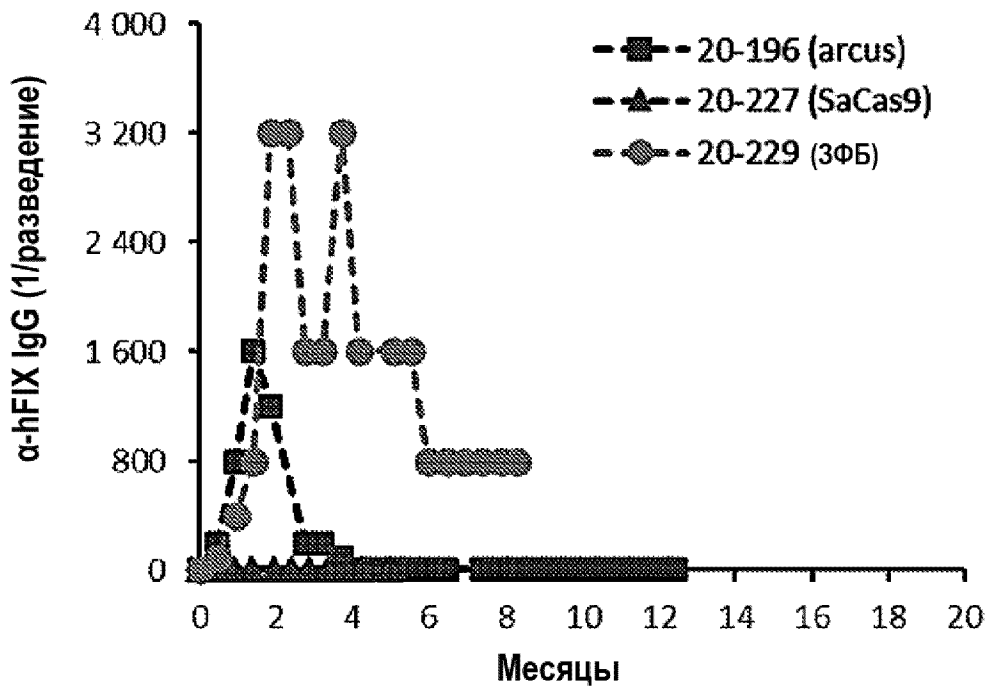
Фиг. 4Е

АЛТ

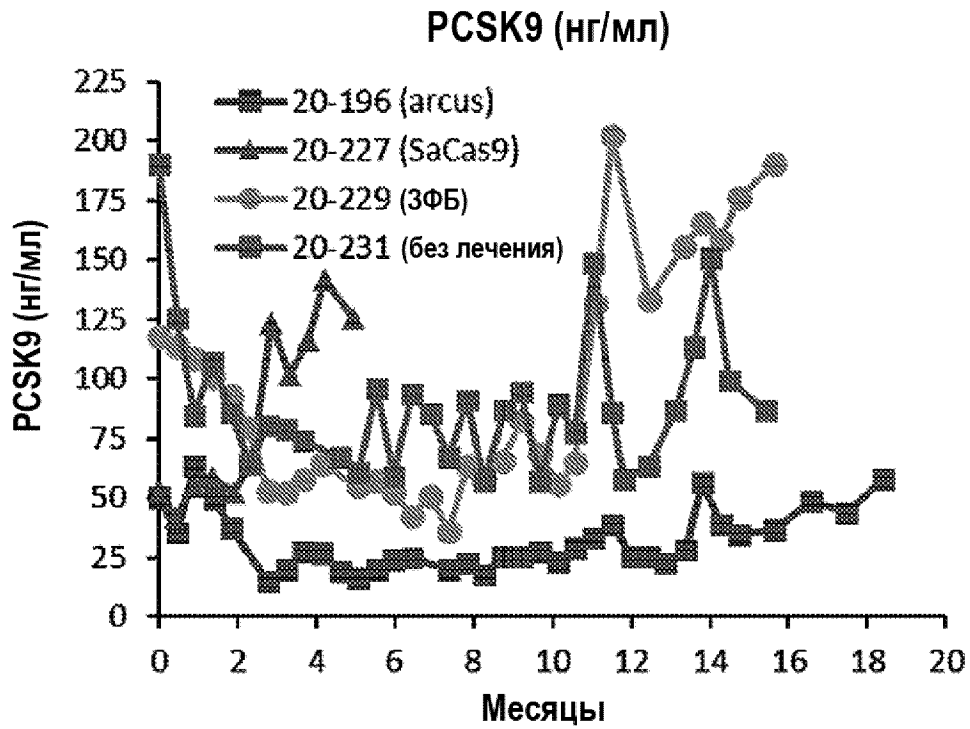


Фиг. 4F

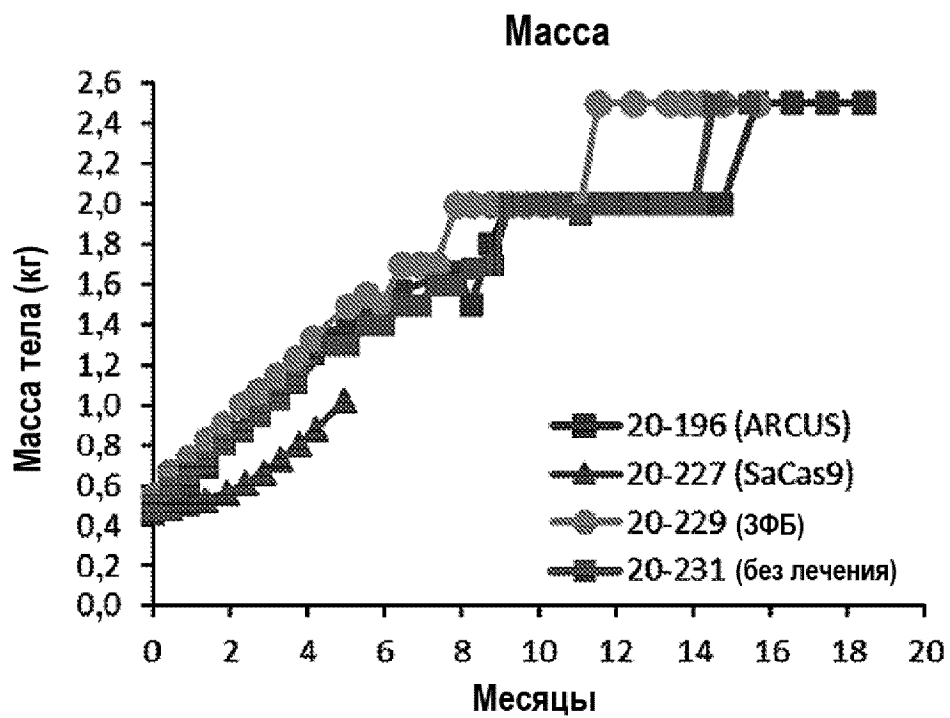
α -hFIX IgG



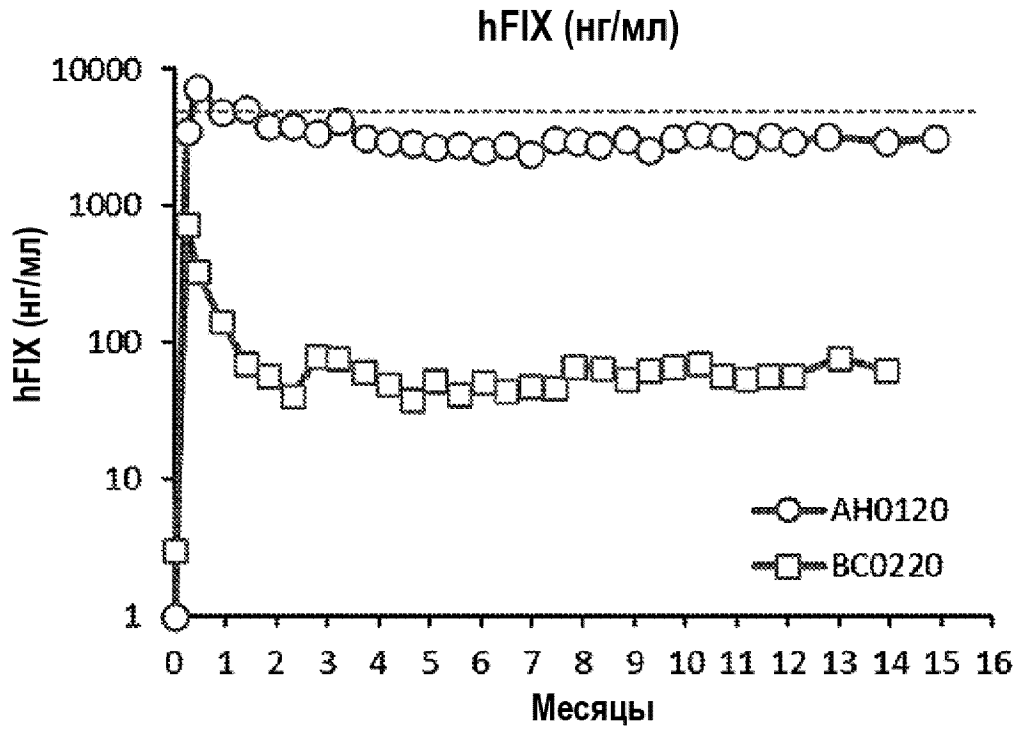
Фиг. 4G



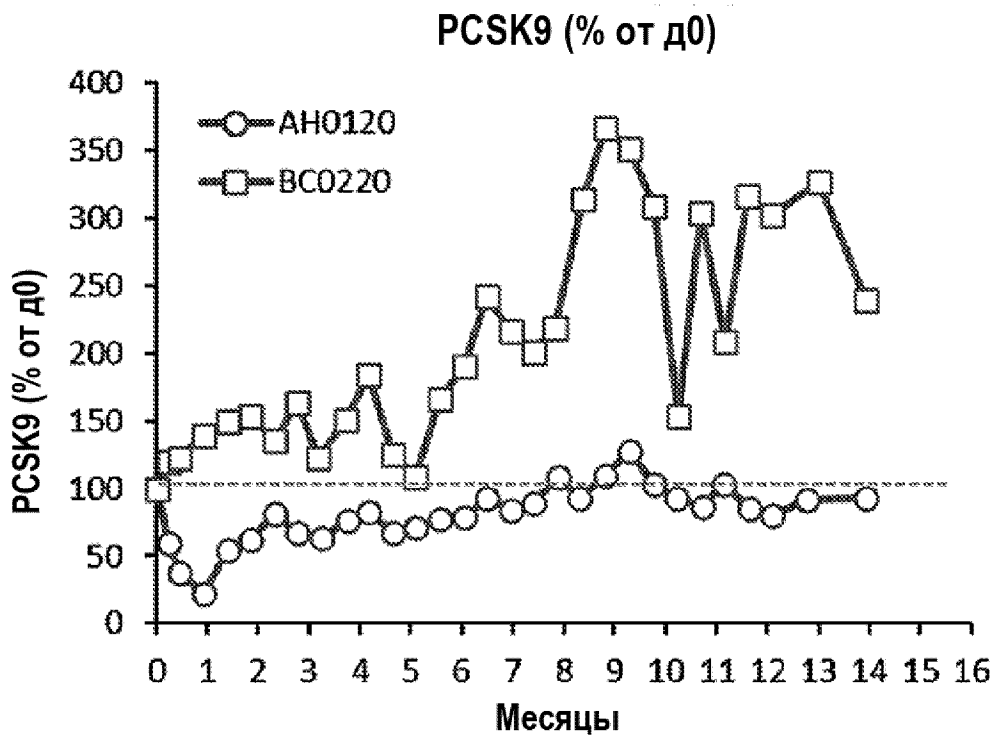
Фиг. 4H



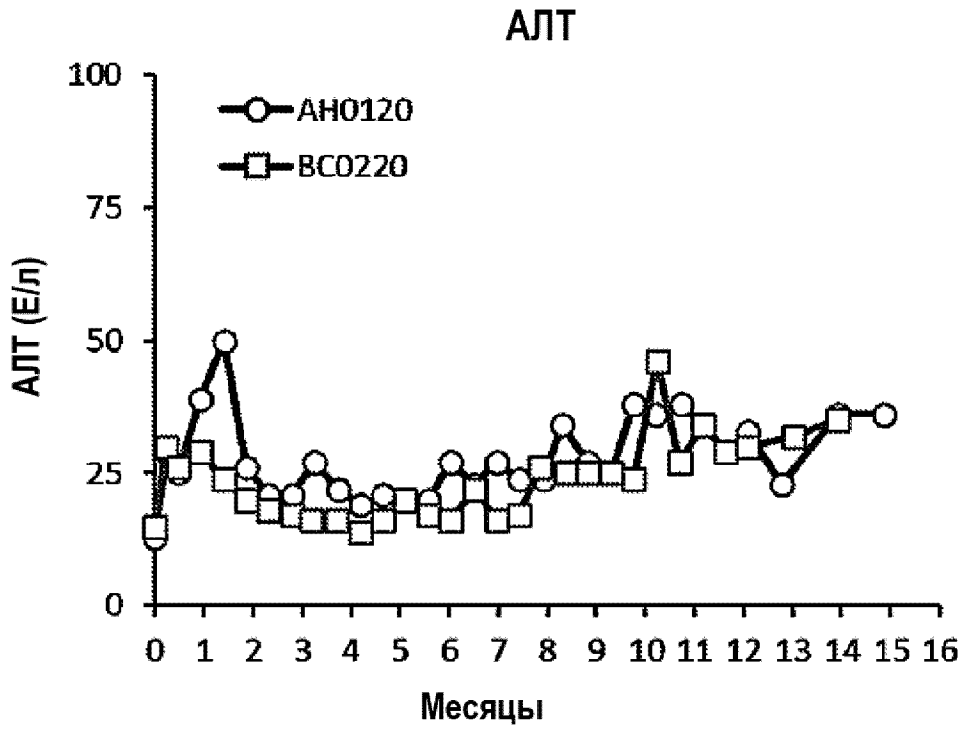
Фиг. 5А



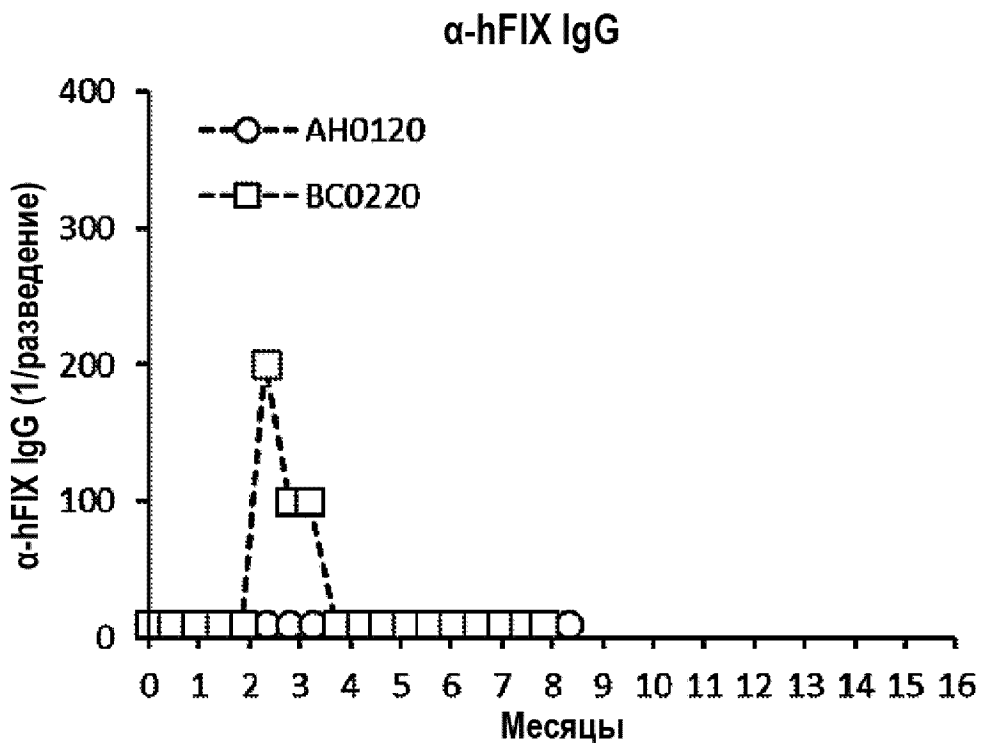
Фиг. 5В



Фиг. 5С

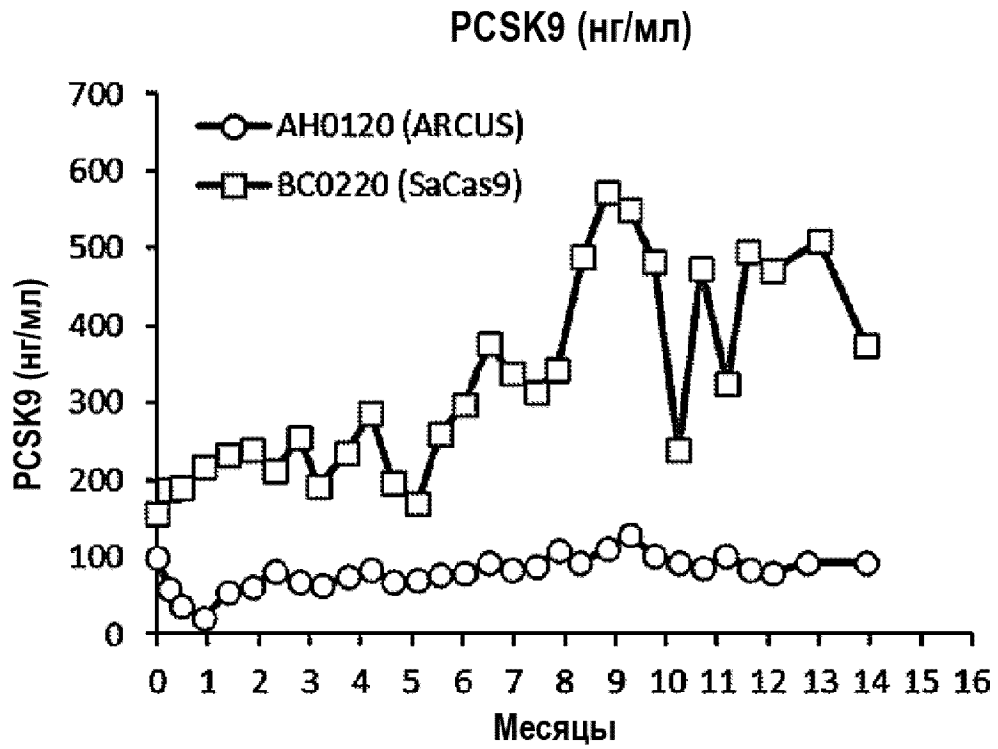


Фиг. 5D

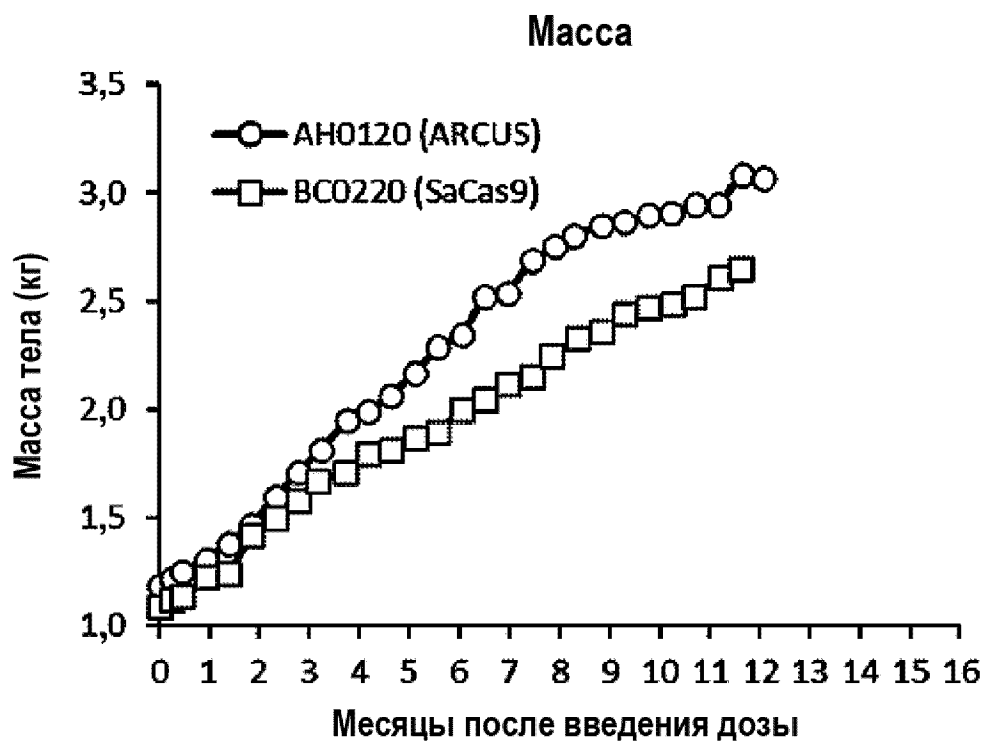


10/43

Фиг. 5Е



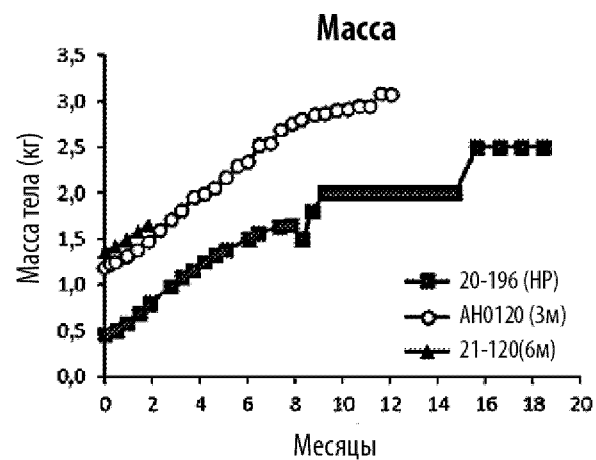
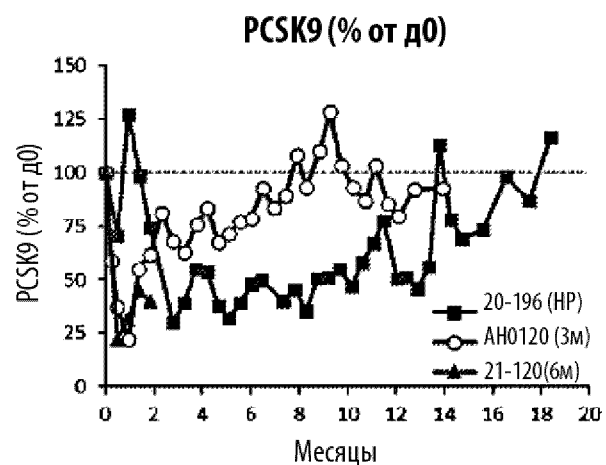
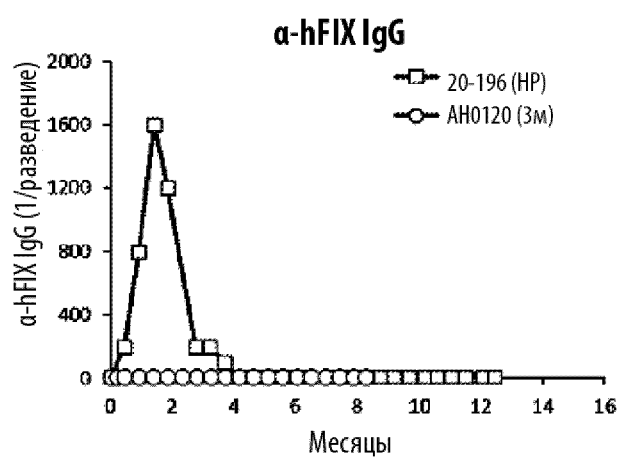
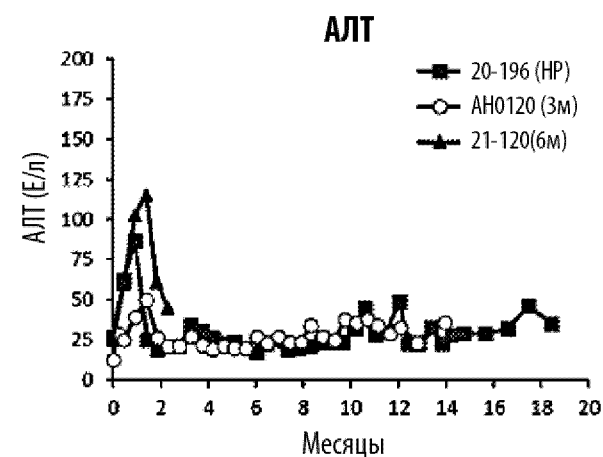
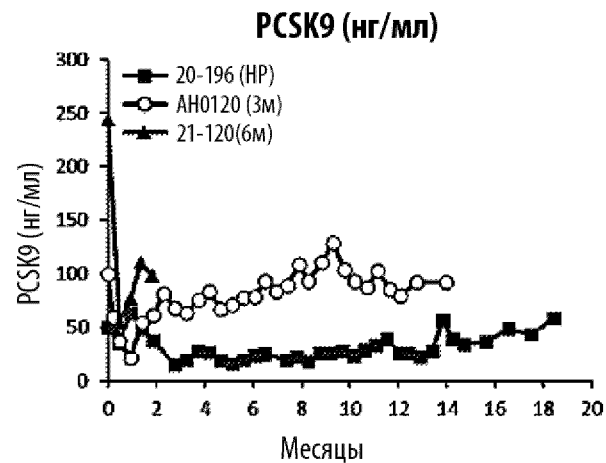
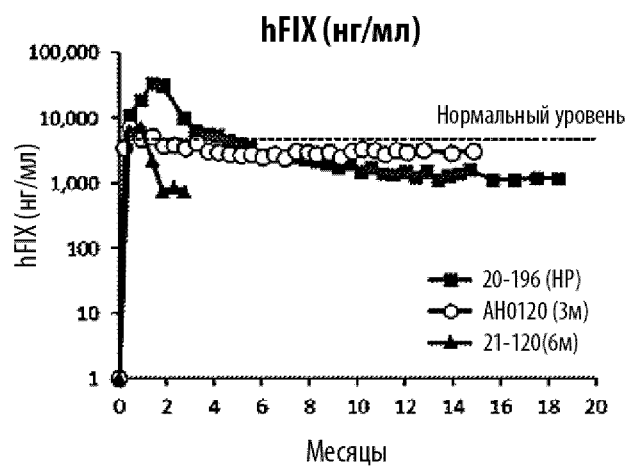
Фиг. 5F



Фиг. 5G

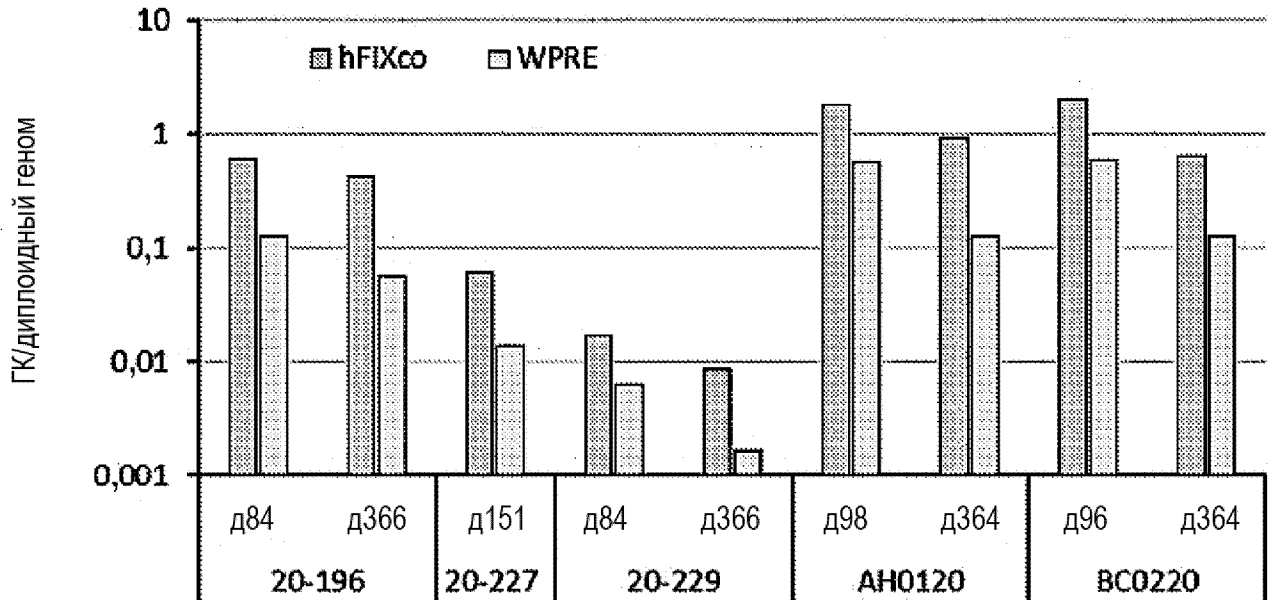
| ID животного | Нуклеаза | Возраст на момент введения (день) | Моменты времени биопсии или некропсии (день) | Пик hFIX (нг/мл) (момент времени) | Последний hFIX (нг/мл) (момент времени) | Анти-hFIX IgG | % трансдукции hFIX | % трансдукции WPRE | % инделов | число локусов по ИКП-секв. |
|--------------|-------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|---|---------------------------------|--------------------|--------------------|-----------|----------------------------|
| 20-196 | ARCUS | 2 | 84 | 32 446 (д43) | 1 169 (д560) | Временно (д14 – д98) | 12,3 | 0,20 | 10,3 | 12, 29 |
| | | | 366 | | | | 11,8 | 0,11 | 12,1 | 3, 28 |
| AH0120 | ARCUS | 89 | 98 | 5 185 (д42) | 3 161 (д448) | < предела выявления | 20,4 | 0,33 | 14,4 | 7, 18 |
| | | | 364 | | | | 20,5 | 0,05 | 22,2 | 29, 19 |
| 21-120 | ARCUS | 191 | 100 | 7 327 (д28) | 753 (д84) | < предела выявления | Запланировано | | | |
| 20-227 | SaCas9 | 2 | 151 | 160 (д13) | 68 (д151) | < предела выявления | 0,8 | 0,02 | 0,11 | 4 |
| BC0220 | SaCas9 | 89 | 96 | 672 (д7) | 62 (д421) | Временно (д70 – д96) | 1,6 | 0,02 | 0,14 | 4, 0 |
| | | | 364 | | | | 0,07 | 0,00 | 0,10 | 1 |
| 20-229 | EGFP | 2 | 84 | 672 (д14) | 1 (д448) | Постоянно (д28 – до настоящего) | 0,1 | 0,00 | 0,10 | 0 |
| 20-231 | Без лечения | 3* | 84 | НД | НД | НД | 0,01 | 0,00 | 0,04 | 0 |

Фиг. 5Н



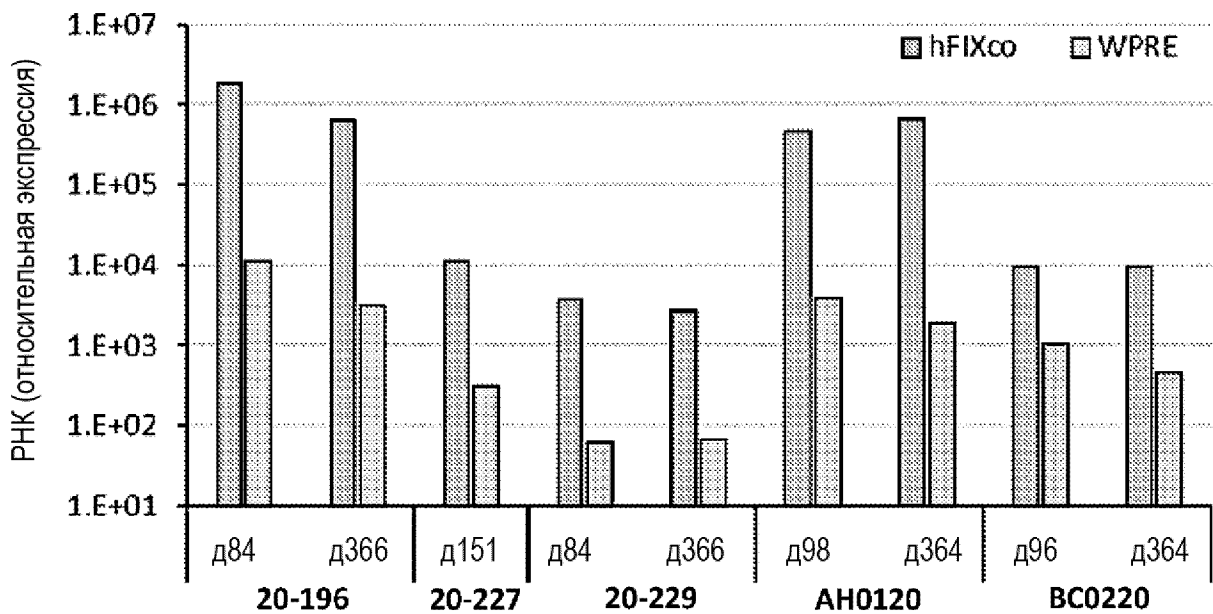
Фиг. 6А

ГК в печени



Фиг. 6В

РНК трансгена в печени



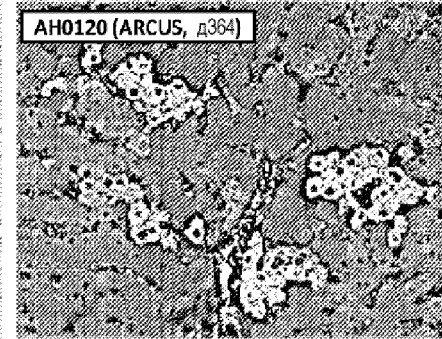
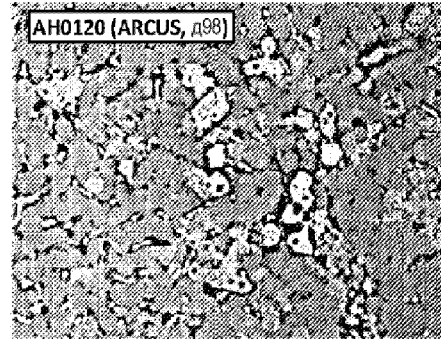
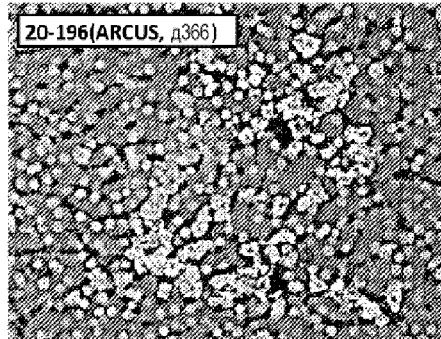
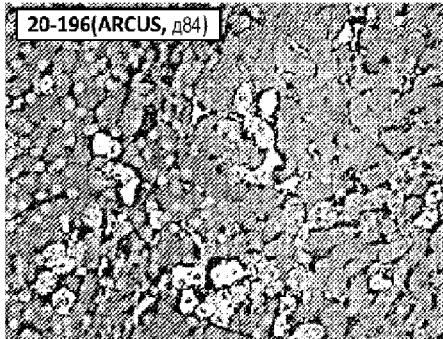
Фиг. 6С

Стабильная трансдукция в печени

Двойная ISH (зеленый = hFIXco, красный = ARCUS или ЗФБ)

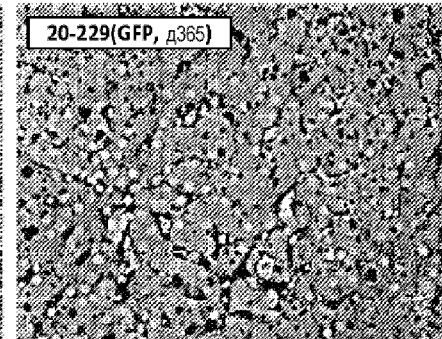
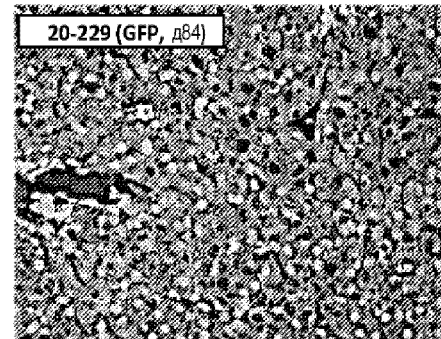
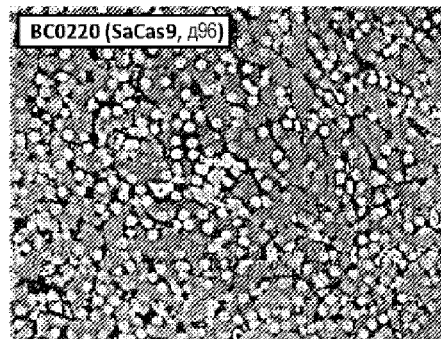
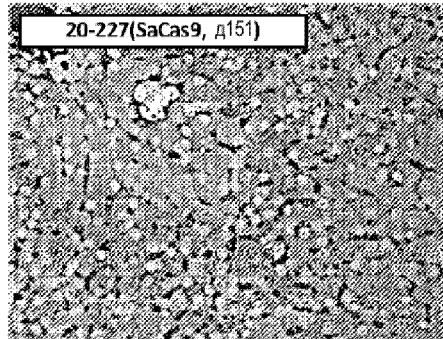
Новорожденный (ARCUS)

3-мес. детеныш (ARCUS)



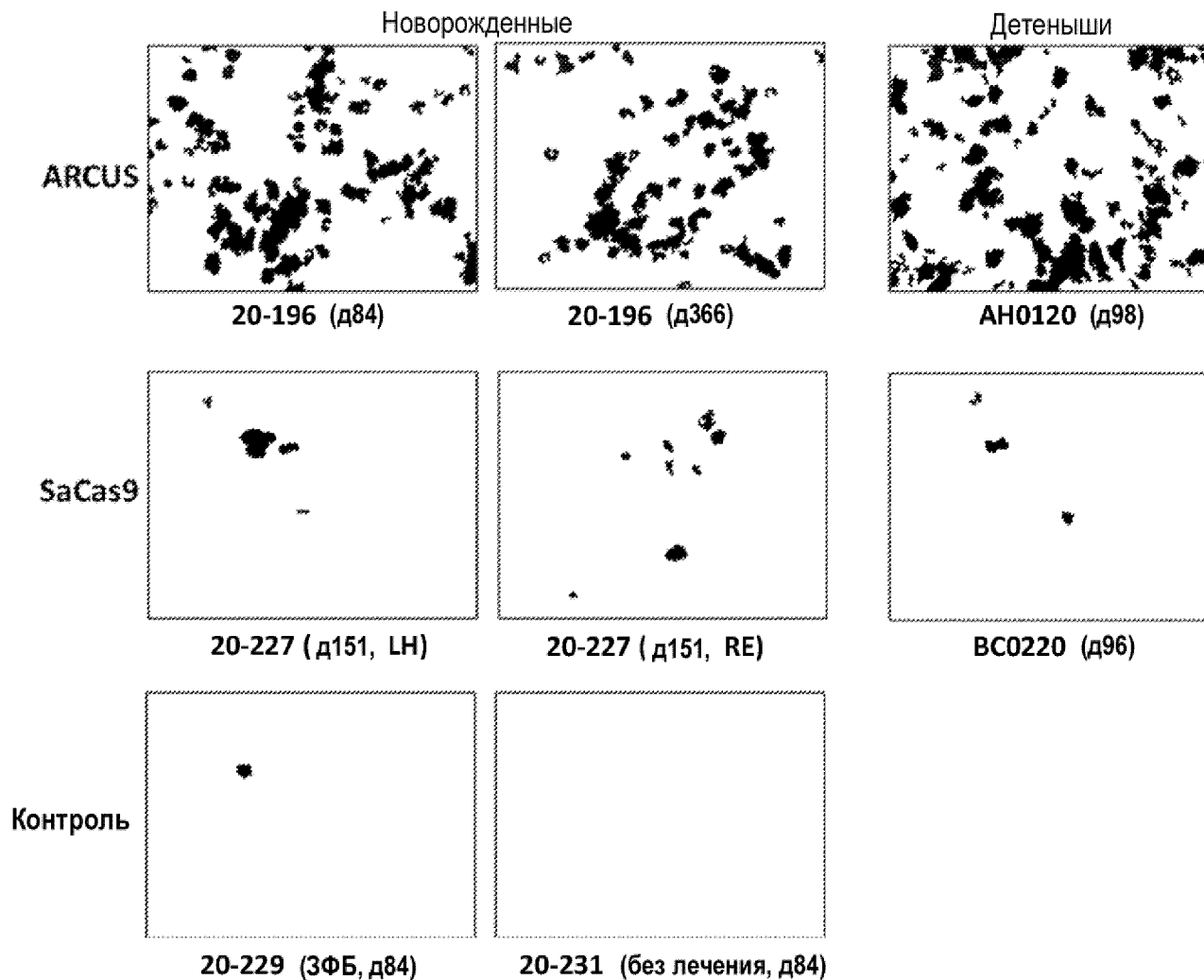
Новорожденный (SaCas9)

Контроль (ЗФБ + донор FIX, новорожденный)



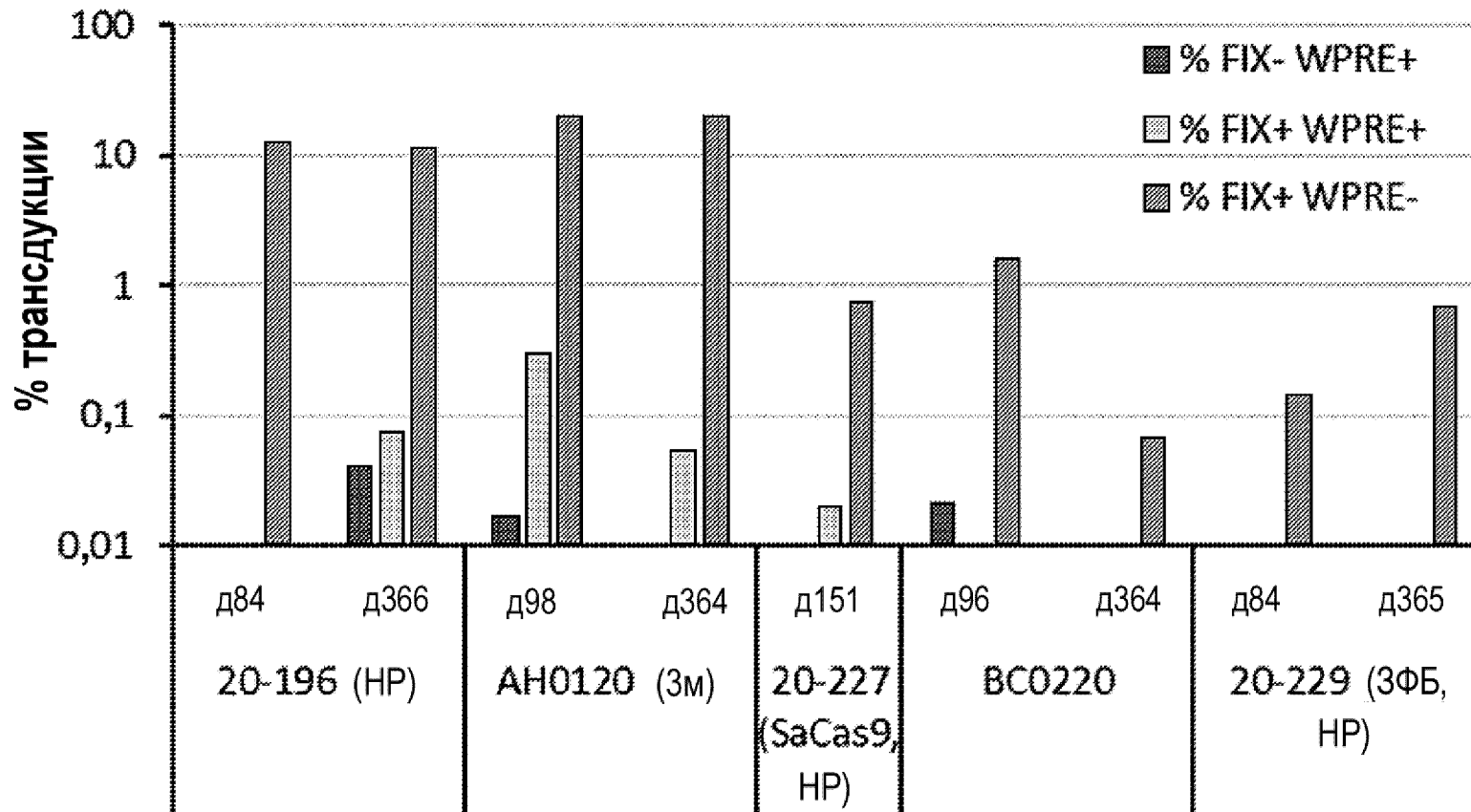
Фиг. 6D

ISH hFIXco – Цифровые изображения для количественного определения % трансдукции

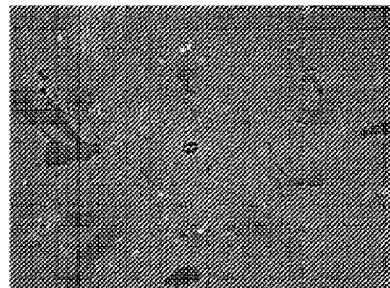


Фиг. 6Е

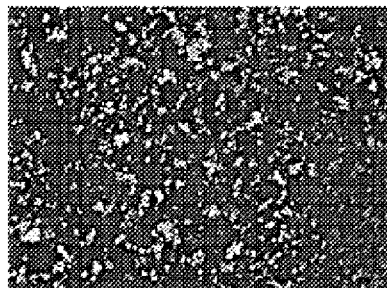
% трансдукции по данным двойной ISH



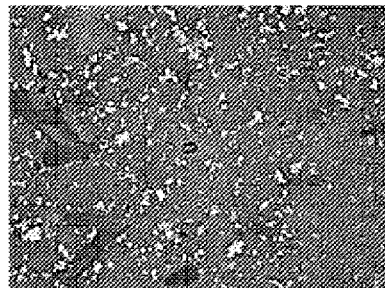
Фиг. 7А
ARCUS



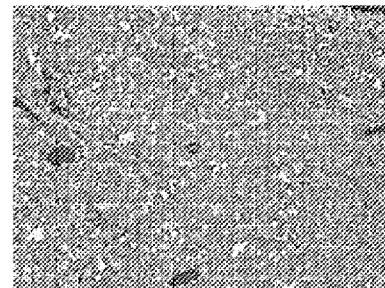
Фиг. 7В
hFIX



Фиг. 7Г
ARCUS + hFIX

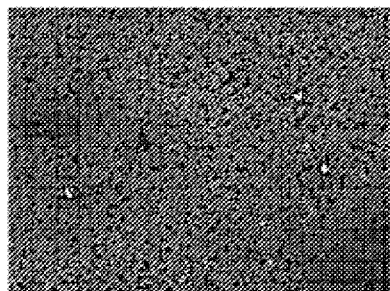


Фиг. 7Д
ARCUS + hFIX + ДАФИ

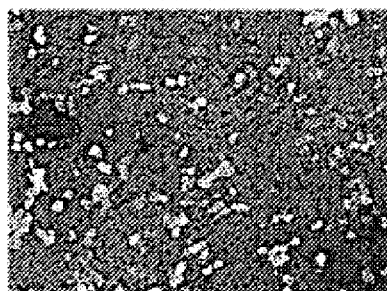


4x

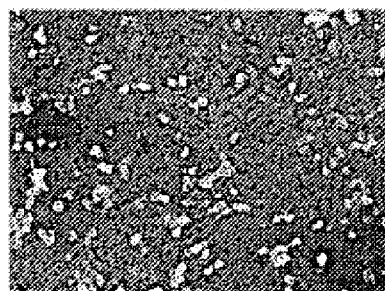
Фиг. 7Е
ARCUS



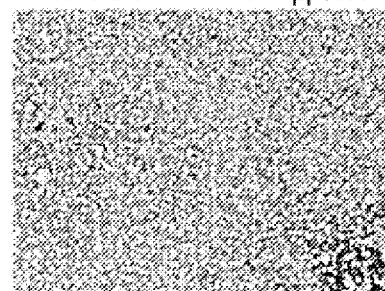
Фиг. 7Ф
hFIX



Фиг. 7Г
ARCUS + hFIX

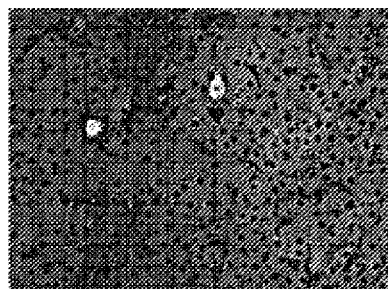


Фиг. 7Н
ARCUS + hFIX + ДАФИ

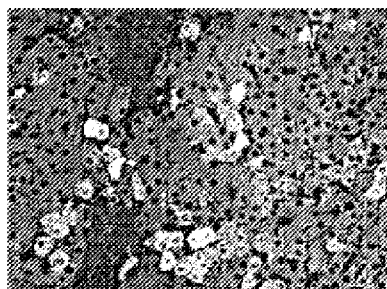


10x

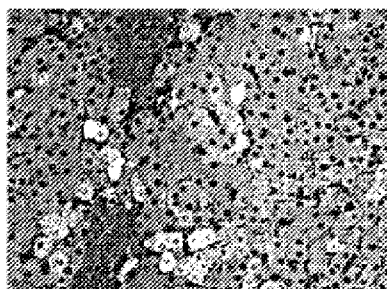
Фиг. 7И
ARCUS



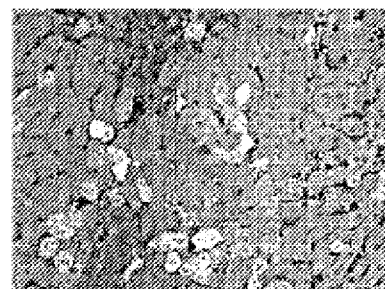
Фиг. 7Ж
hFIX



Фиг. 7К
ARCUS + hFIX



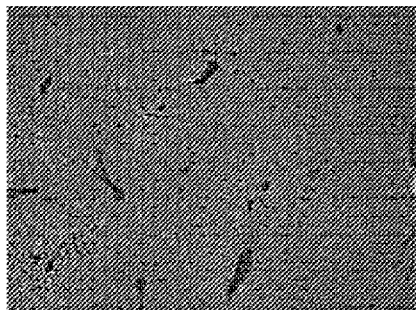
Фиг. 7Л
ARCUS + hFIX + ДАФИ



20x

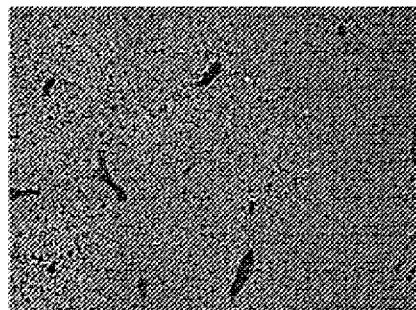
Фиг. 8А

ЗФБ



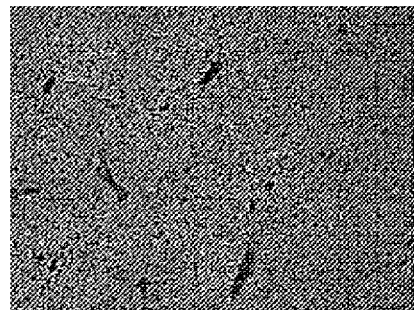
Фиг. 8В

hFIX



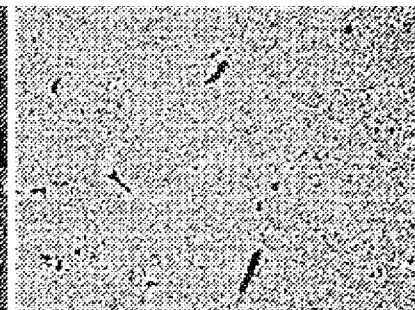
Фиг. 8С

ЗФБ + hFIX



Фиг. 8D

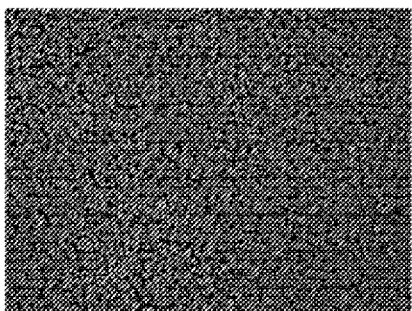
ЗФБ + hFIX + ДАФИ



4x

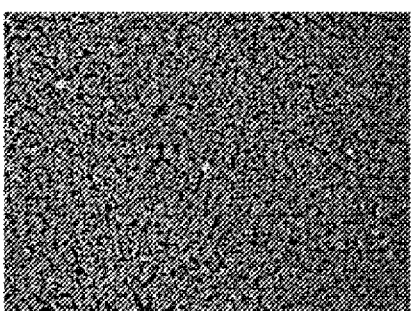
Фиг. 8Е

ЗФБ



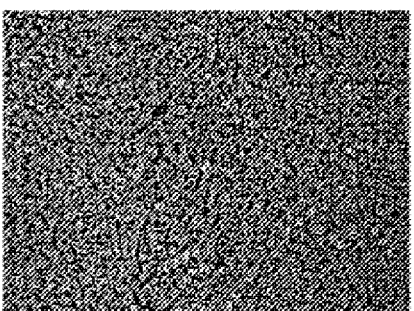
Фиг. 8F

hFIX



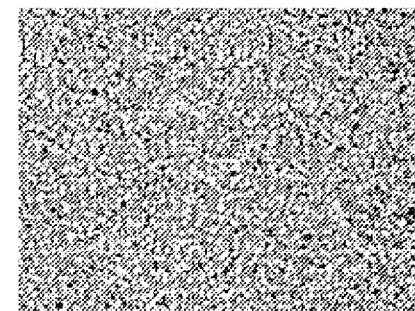
Фиг. 8G

ЗФБ + hFIX



Фиг. 8H

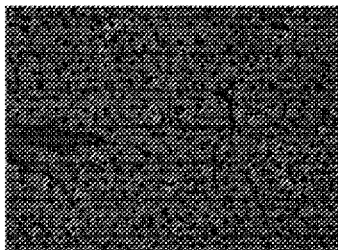
ЗФБ + hFIX + ДАФИ



10x

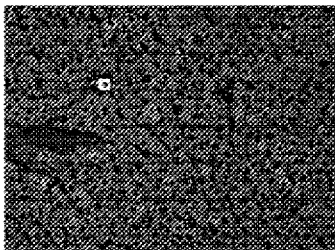
Фиг. 8I

ЗФБ



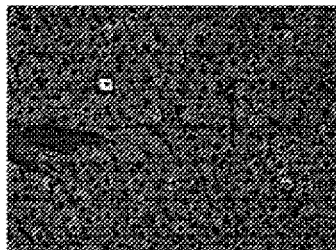
Фиг. 8J

hFIX



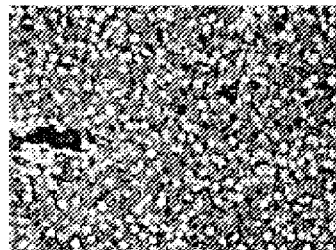
Фиг. 8K

ЗФБ + hFIX



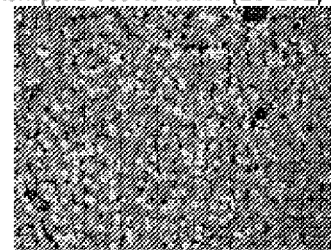
Фиг. 8L

ЗФБ + hFIX + ДАФИ



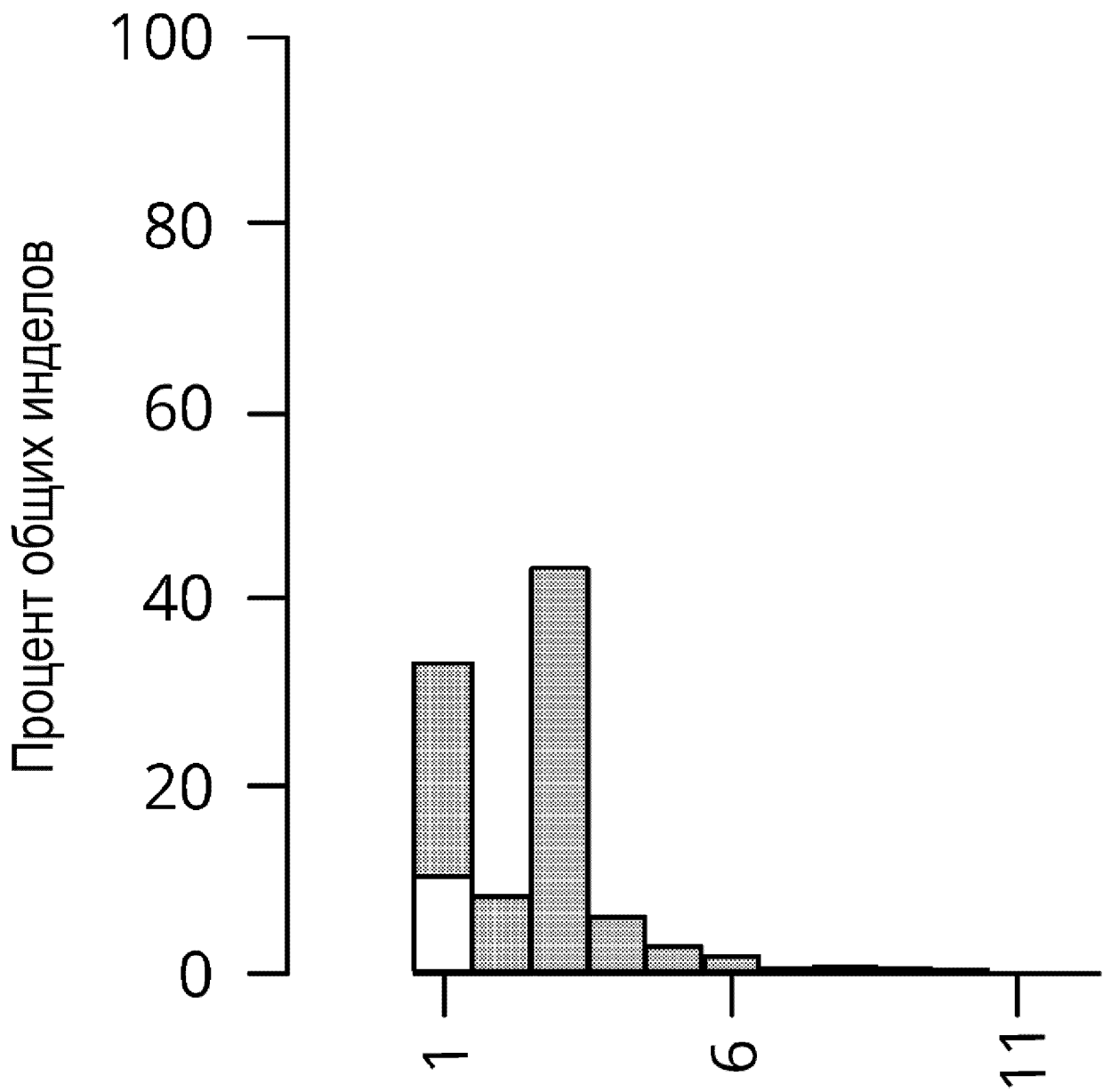
Фиг. 8M

Контроль без лечения (20-231)

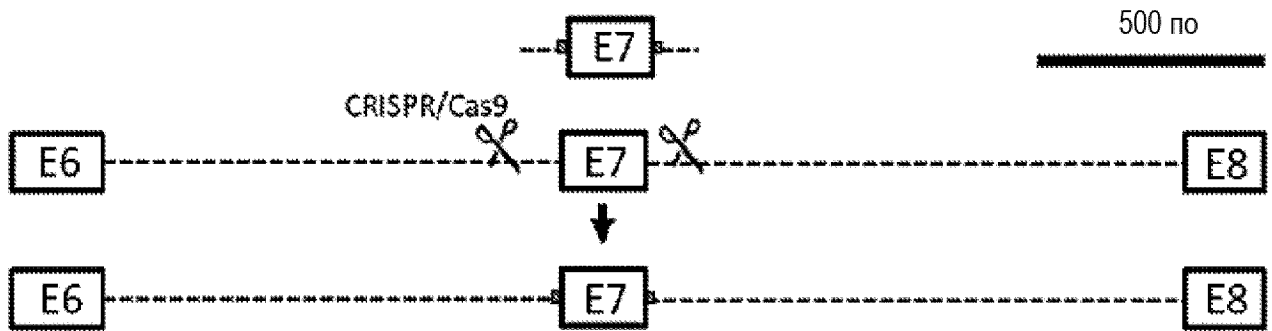


20x

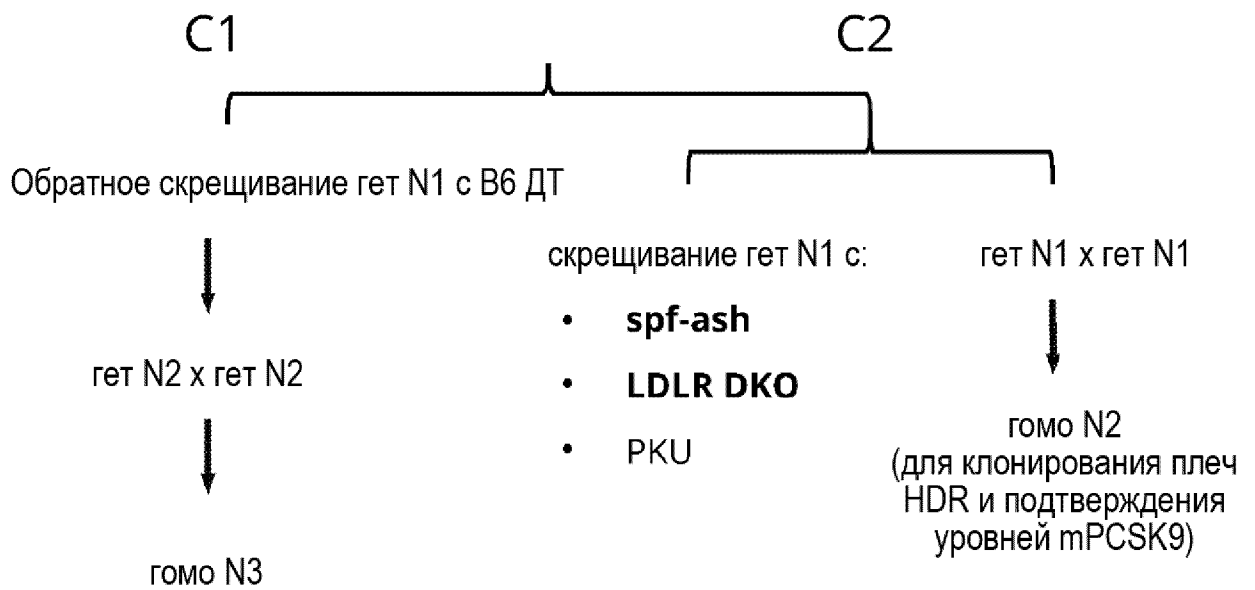
Фиг. 9



Фиг. 10А



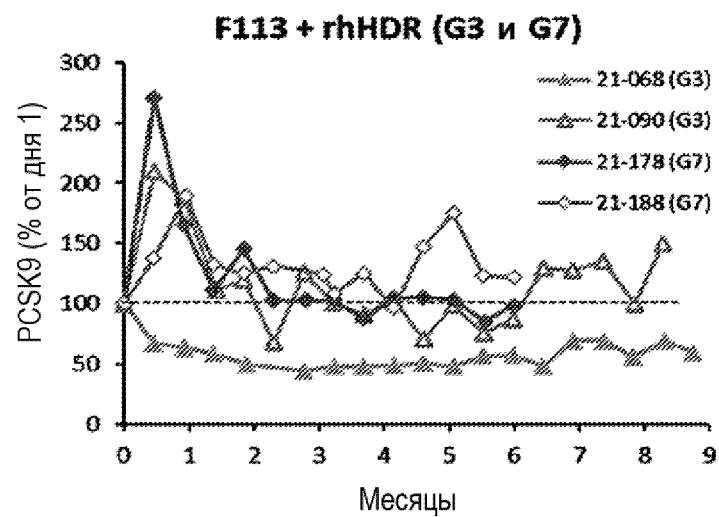
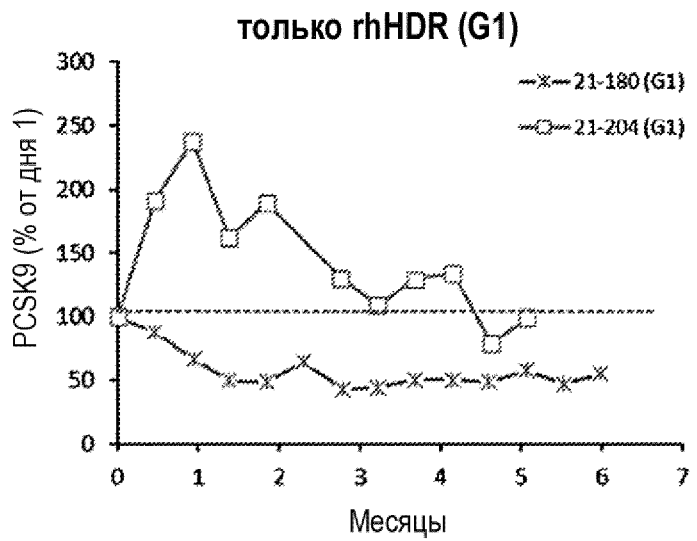
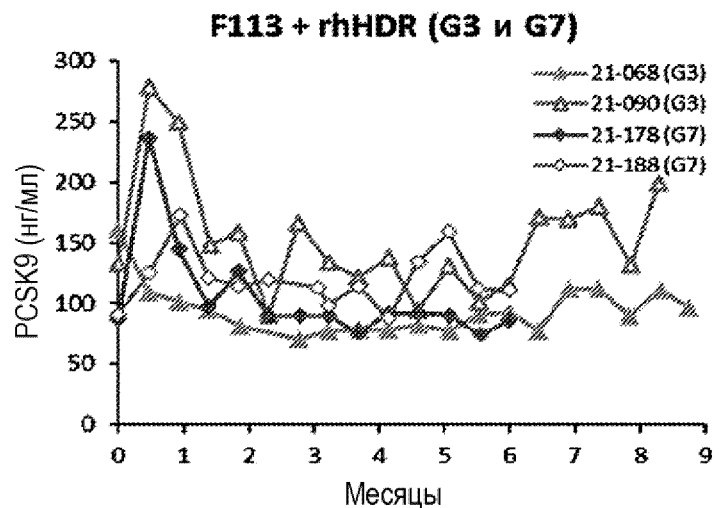
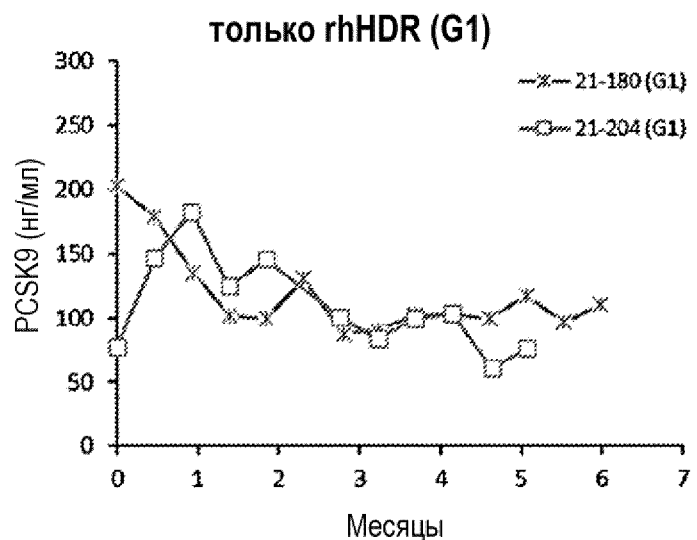
Фиг. 10В



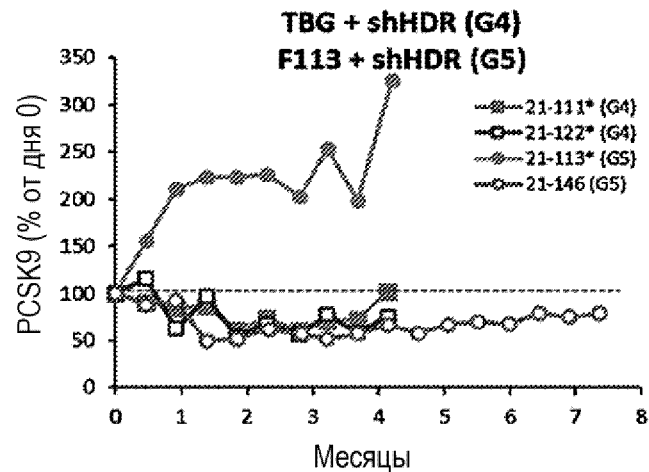
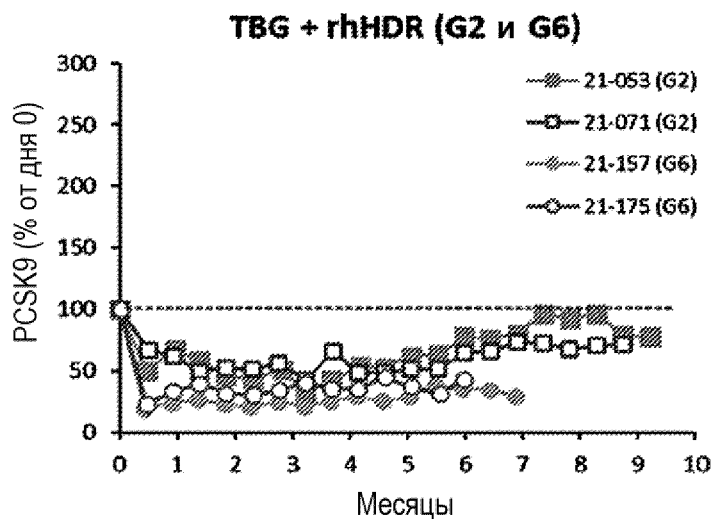
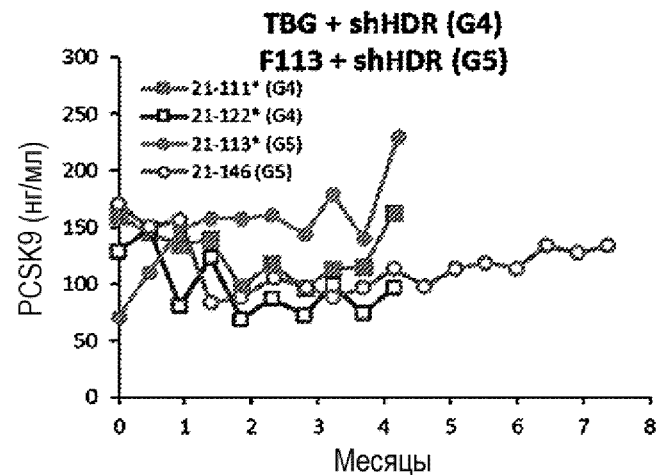
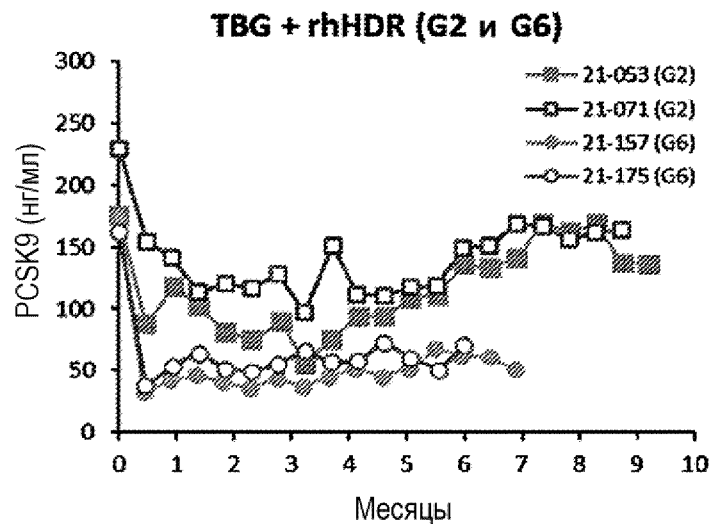
Фиг. 11А

| ПЛЕЧИ HDR | Промотор (нуклеазный вектор) | Серотип | Группа | ID животного | Пол | Возраст в момент введения (день) | Титр анти-AAV Vab (в день 0) | Биопсия (день) | Трансдукция | | Ампликон- секв. | ИКП- секв. |
|--------------|------------------------------------|---------|--------|--------------|-----|---|---------------------------------------|-------------------|-------------|--------|--------------------|-----------------------|
| | | | | | | | | | ISH OTC | IF OTC | % инделов | число сайтов OT |
| Длинное | - | AAVrh79 | G1 | 21-180 | М | 13 | 50 | 85 | 0,1 | 0,6 | 0,09 | 0 |
| | | | | 21-204 | Ж | 1 | 50 | 84 | 1,0 | 0,7 | 0,06 | 0; 0 |
| Короткое | F113 | AAVrh79 | G5 | 21-146 | Ж | 7 | 50 | 84 | 2,3 | 1,3 | 1,5 | 0; 0 |
| | | | | 21-113* | Ж | 15 | 1600 | 86 | 0 | 0 | 0,1 | Б.Л. |
| | TBG | AAVrh79 | G4 | 21-111* | Ж | 16 | 400 | 85 | 0 | 0 | 0,1 | Б.Л. |
| 21-122* | | | | Ж | 11 | 1600 | 85 | 0 | 0 | 0,1 | Б.Л. | |
| Длинное | F113 | AAVhu37 | G3 | 21-068 | М | 7 | 50 | 84 | 8,9 | 5,4 | 2,6 | 2; 2 |
| | | | | 21-090 | М | 6 | 25 | 86 | 0,9 | 1,1 | 0,7 | 0; 0 |
| | | AAVrh79 | G7 | 21-178 | М | 10 | Б.Л. ^а | 85 | 1,9 | 2,2 | 0,9 | 0; 0 |
| | | | | 21-188 | М | 3 | 25 | 93 | 1,6 | 2,6 | 0,7 | 0; 1 |
| | TBG | AAVhu37 | G2 | 21-053 | Ж | 9 | 100 | 86 | 4,5 | 4,0 | 4,5 | 4; 3 |
| | | | | 21-071 | М | 9 | 50 | 84 | 3,7 | 2,9 | 3,9 | 2; 0; 2 |
| | | AAVrh79 | G6 | 21-157 | Ж | 6 | 25 | 84 | 16,9 | 18,6 | 12,8 | 27; 18 |
| 21-175 | Ж | | | 11 | <25 | 84 | 10,3 | 11,9 | 13,5 | 40; 27 | | |

Фиг. 11В-1

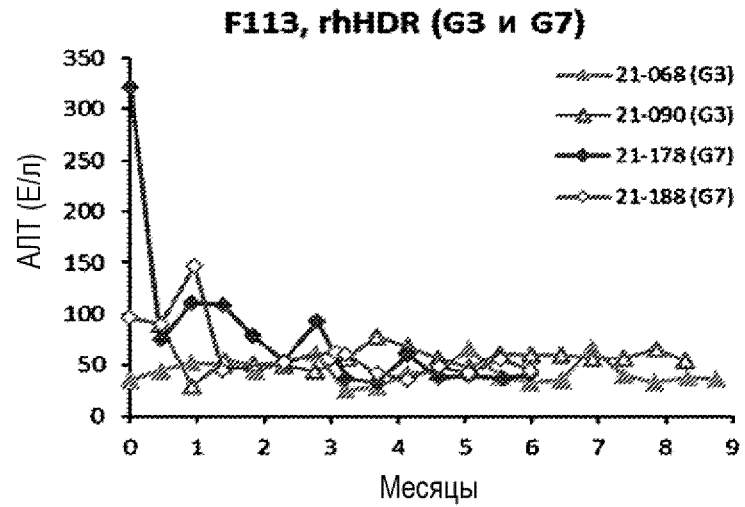
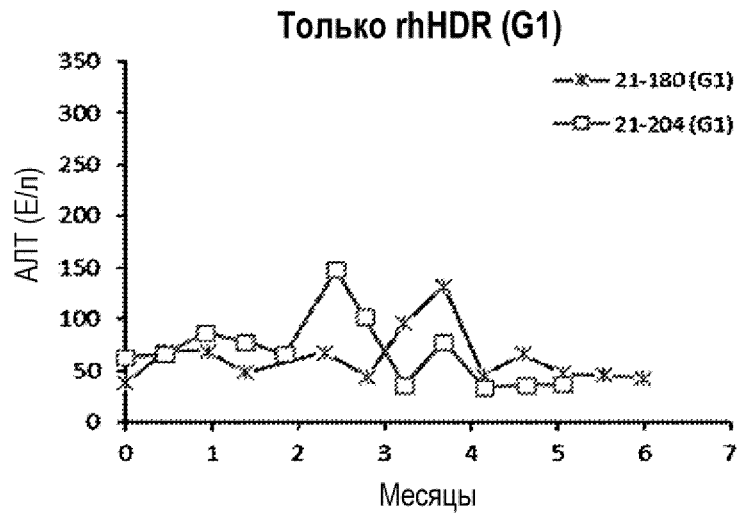
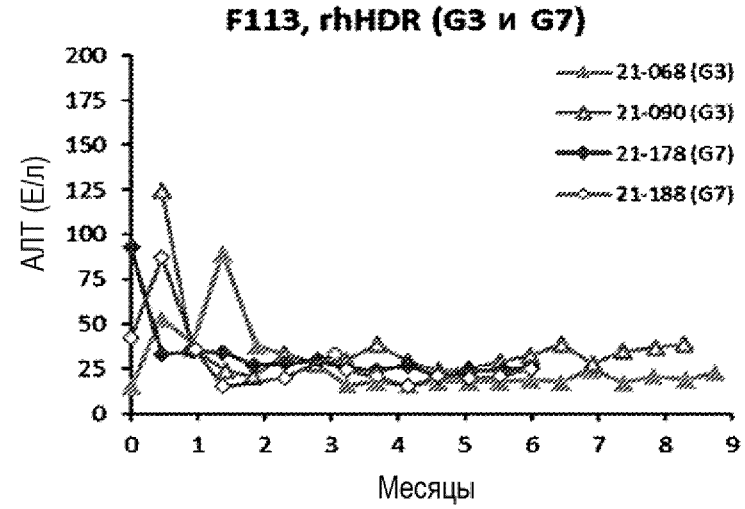
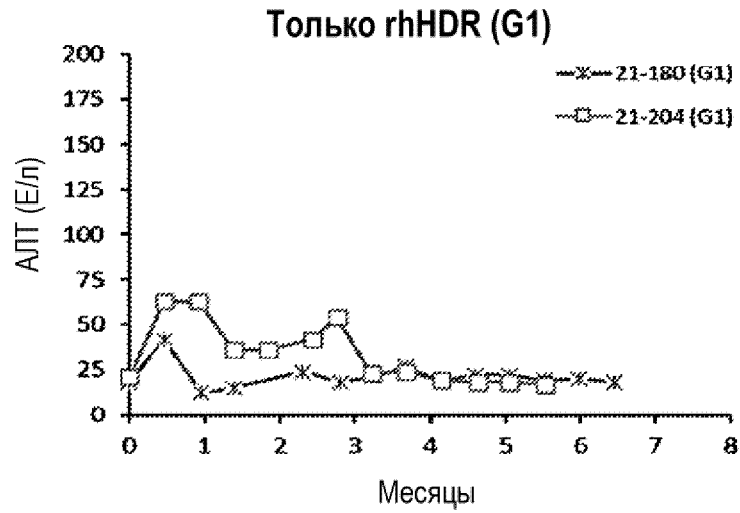


Фиг. 11В-2

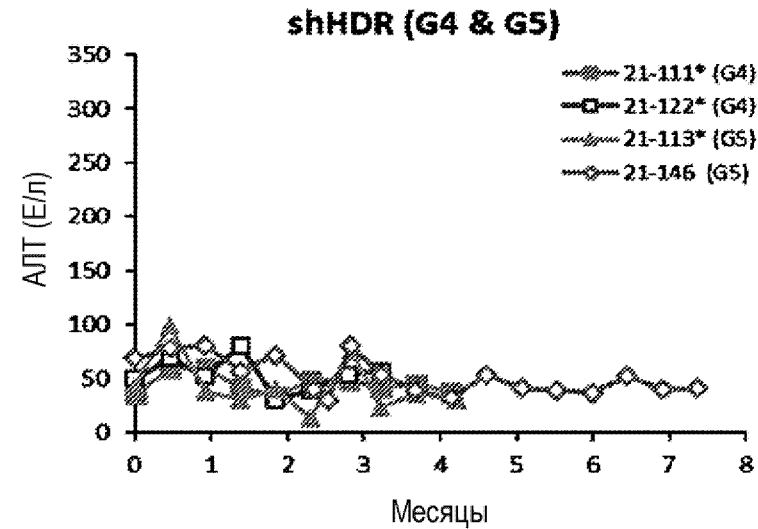
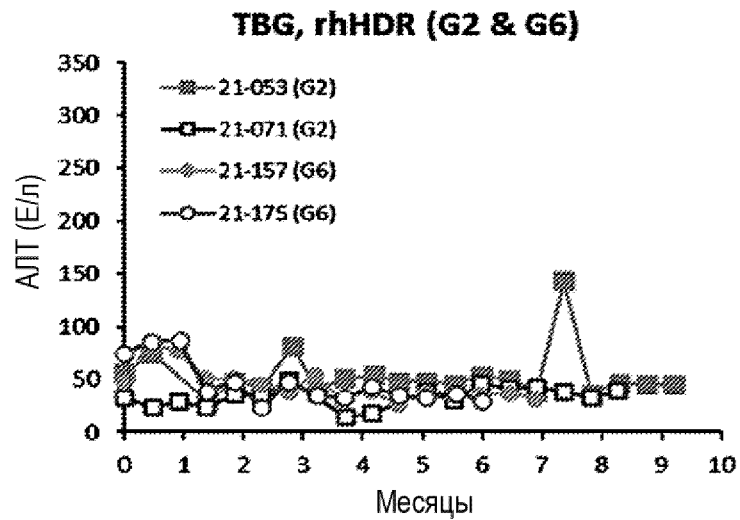
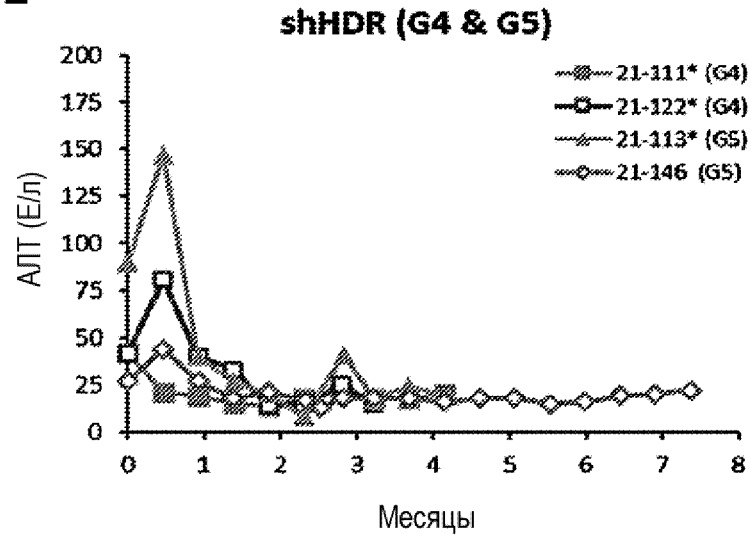
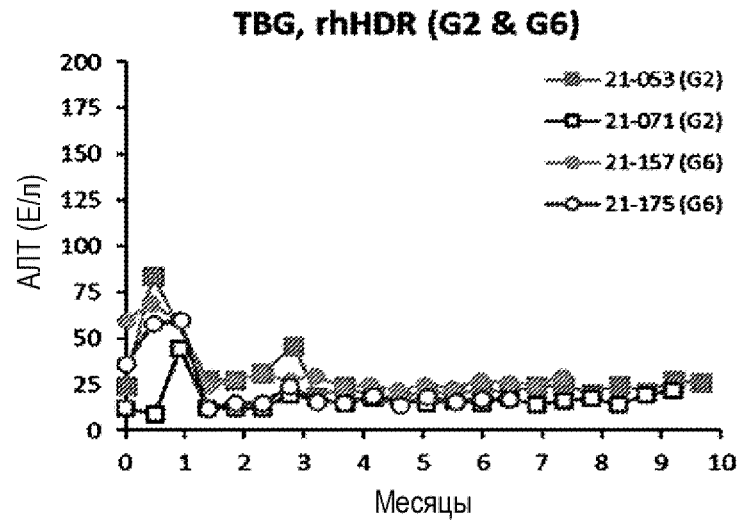


* ВАб-положительный в день 0

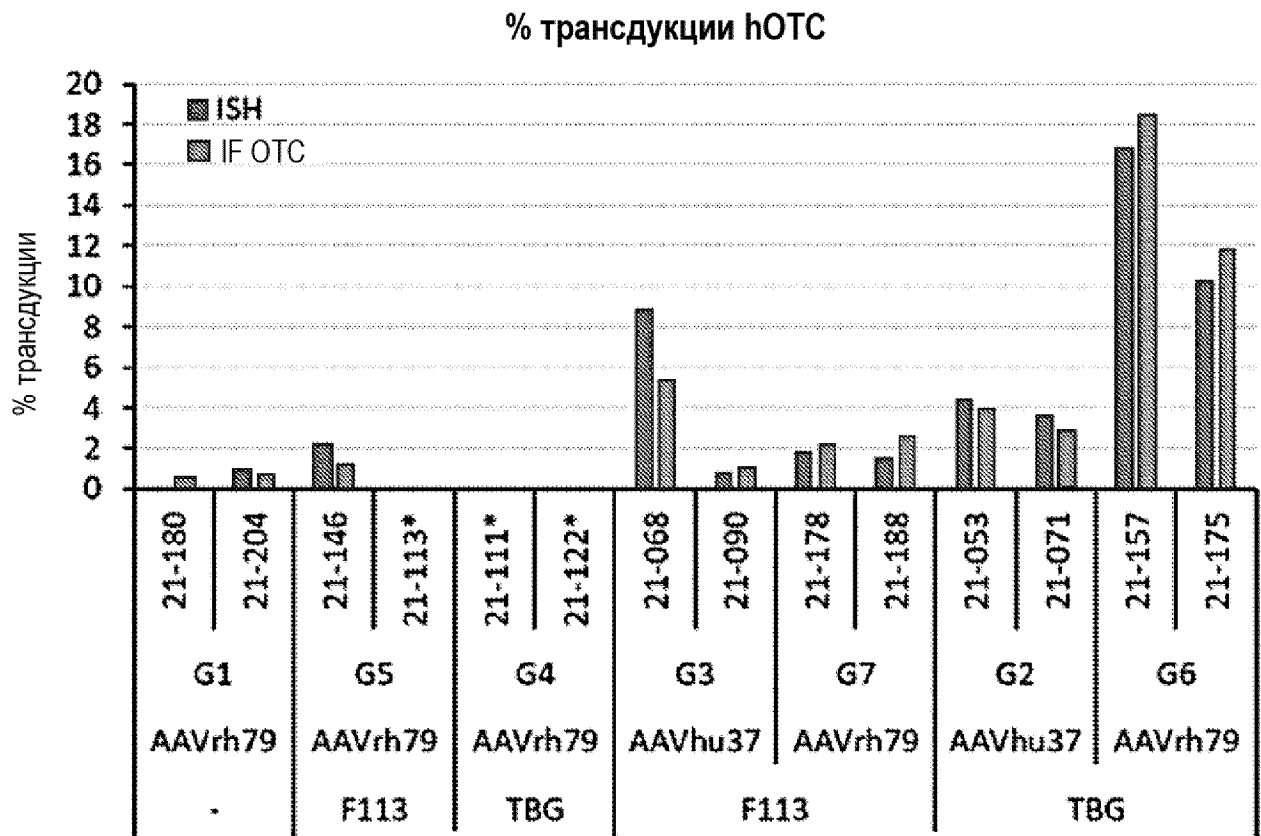
Фиг. 11С-1



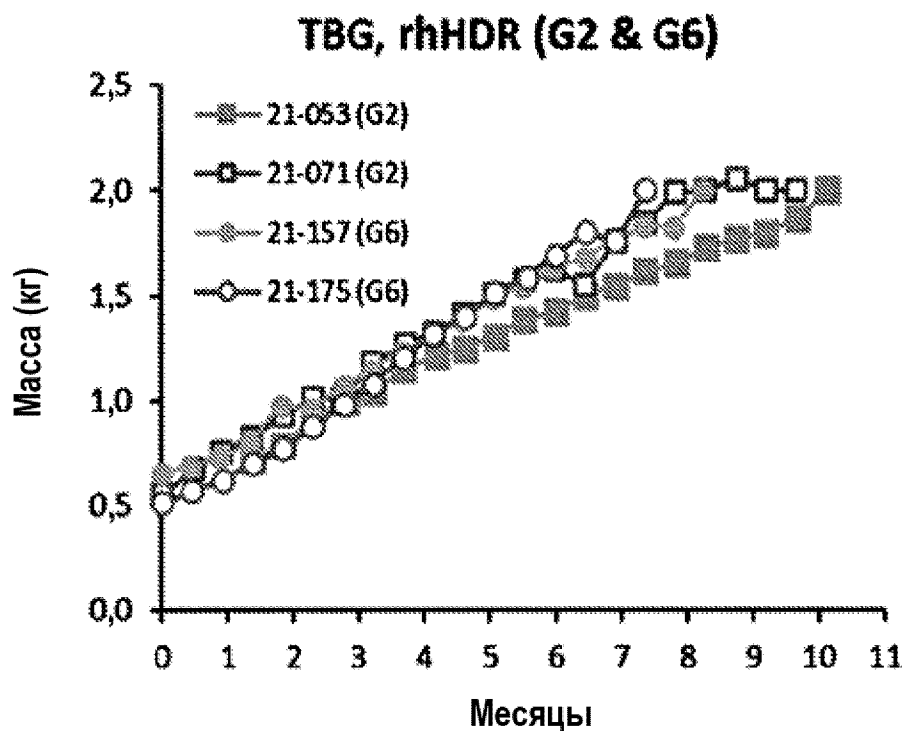
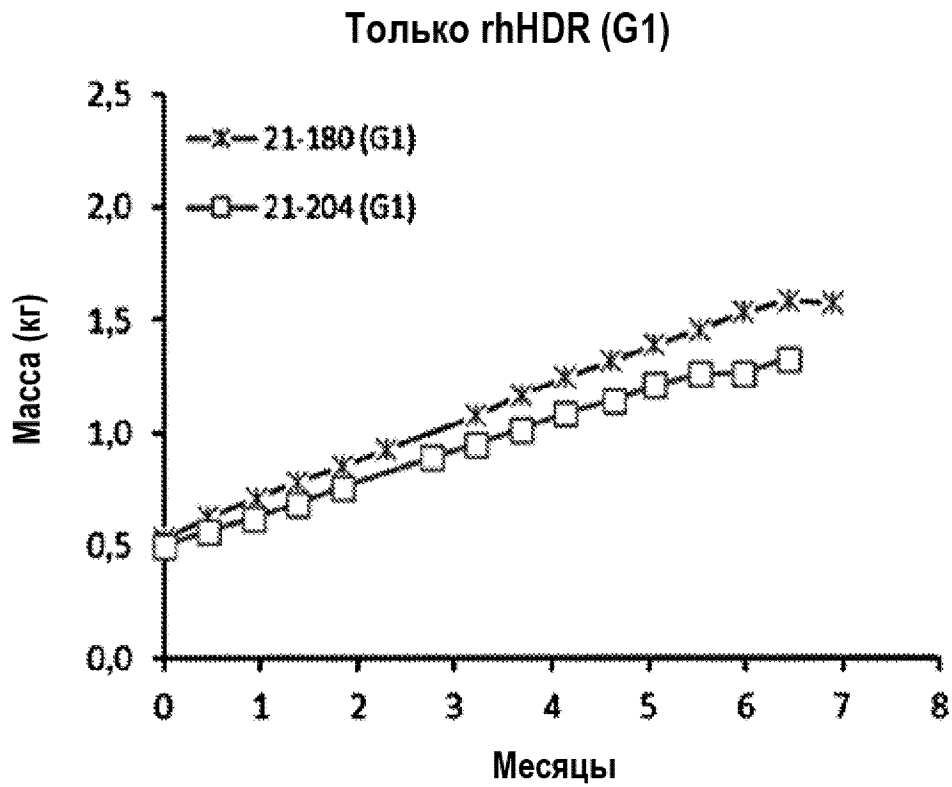
Фиг. 11С-2



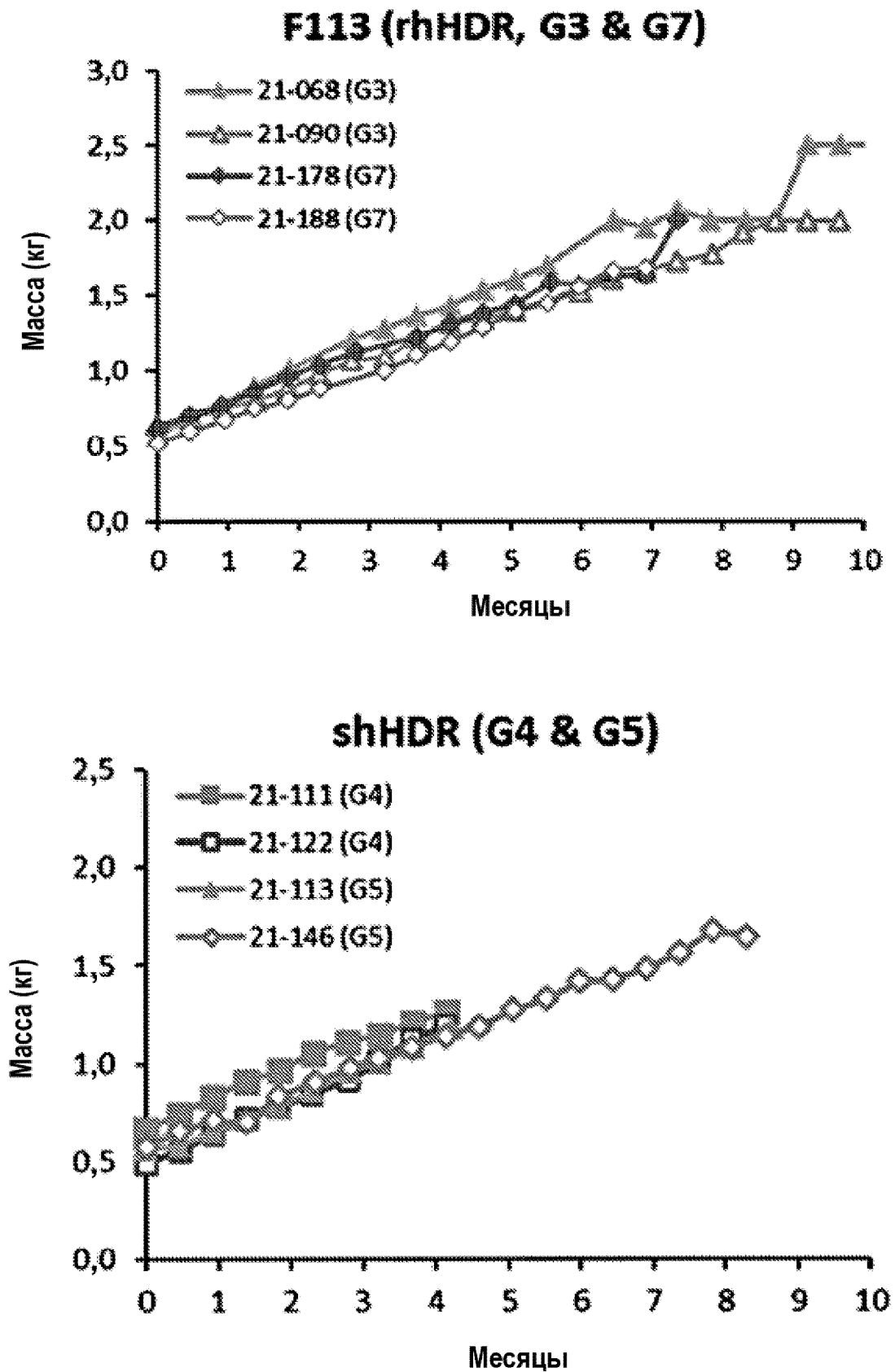
Фиг. 11D



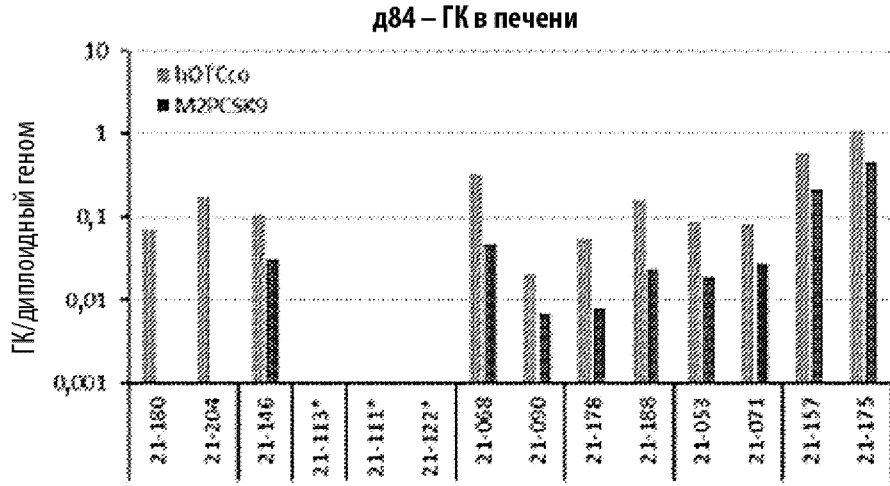
Фиг. 11Е-1



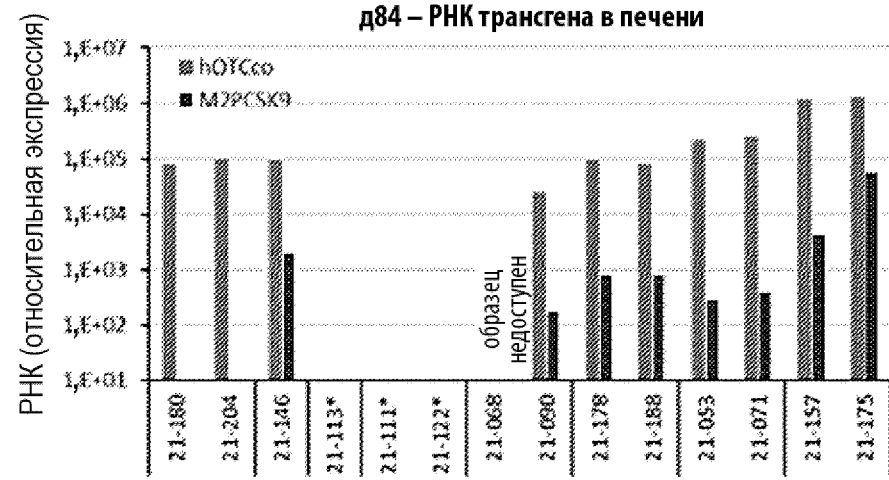
Фиг. 11Е-2



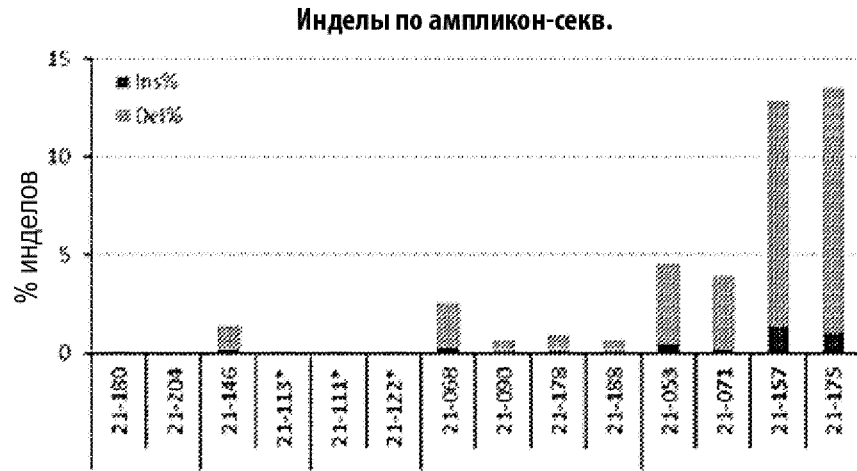
Фиг. 11F



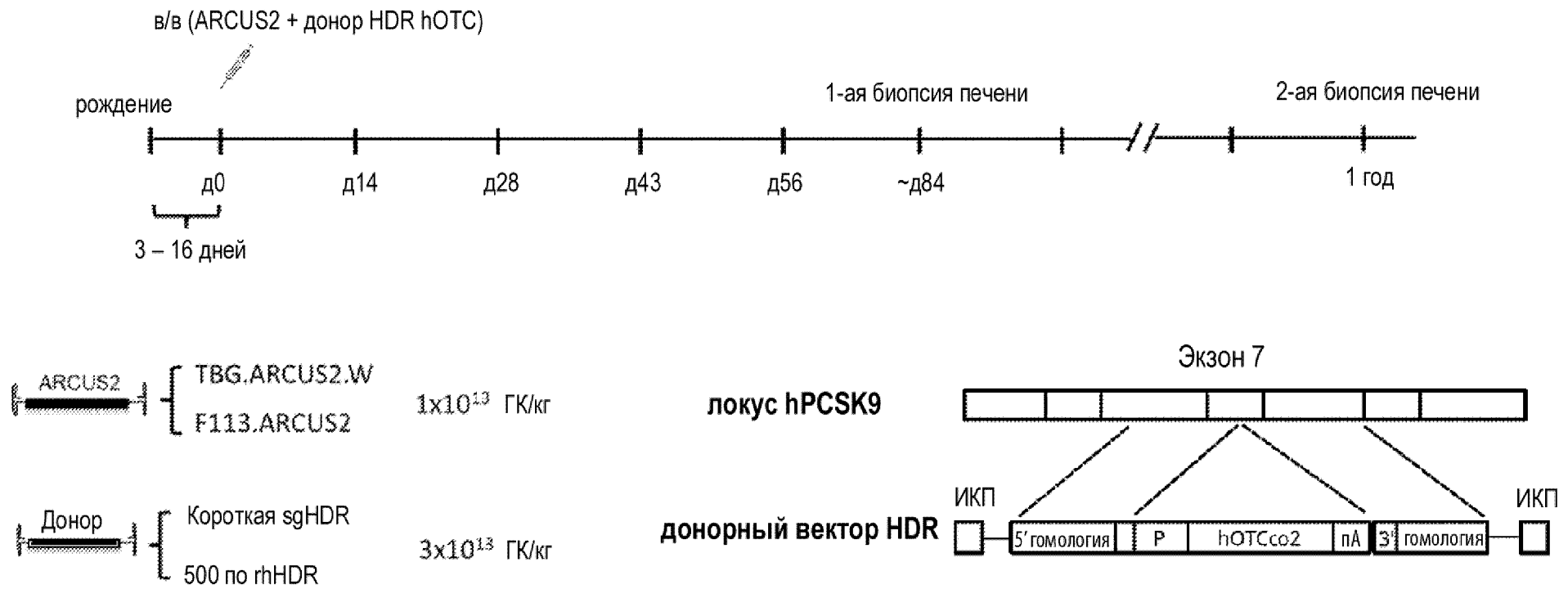
Фиг. 11G



Фиг. 11H



Фиг. 111



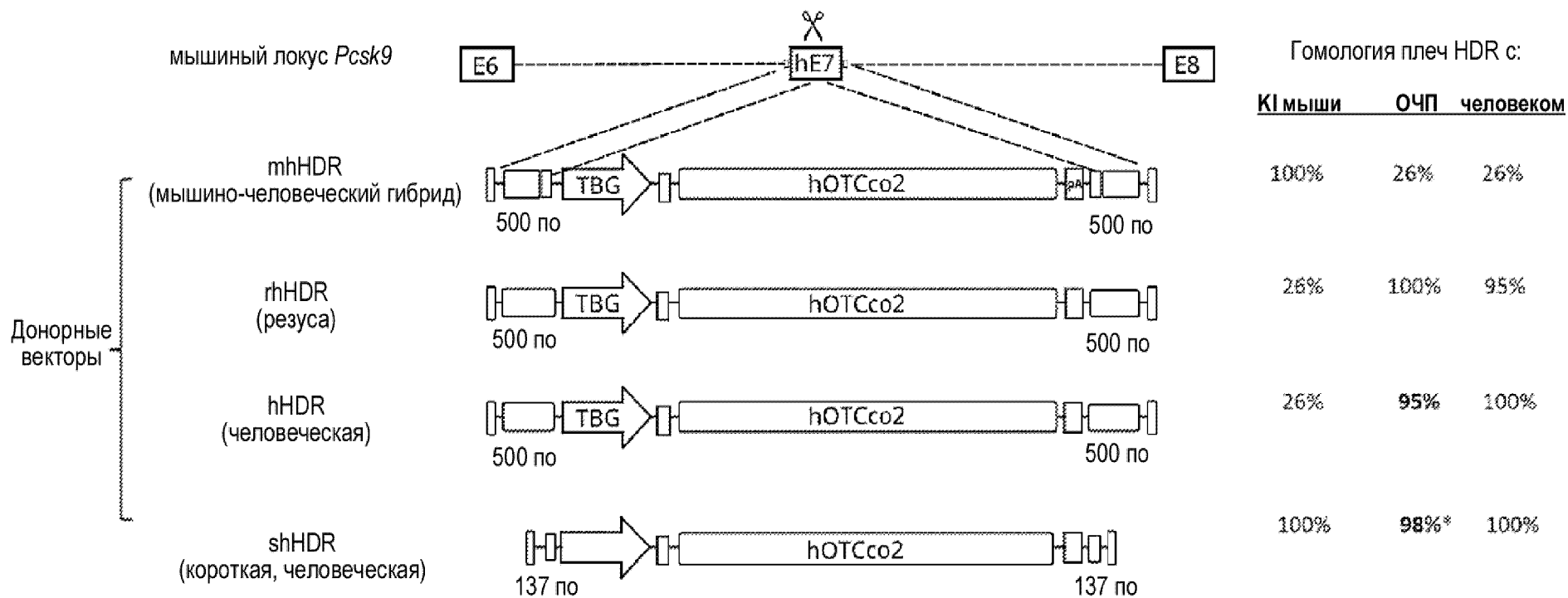
30/43

Серотипы: AAVhu37 (n=4); AAVrh79 (n=10)

Фиг. 12

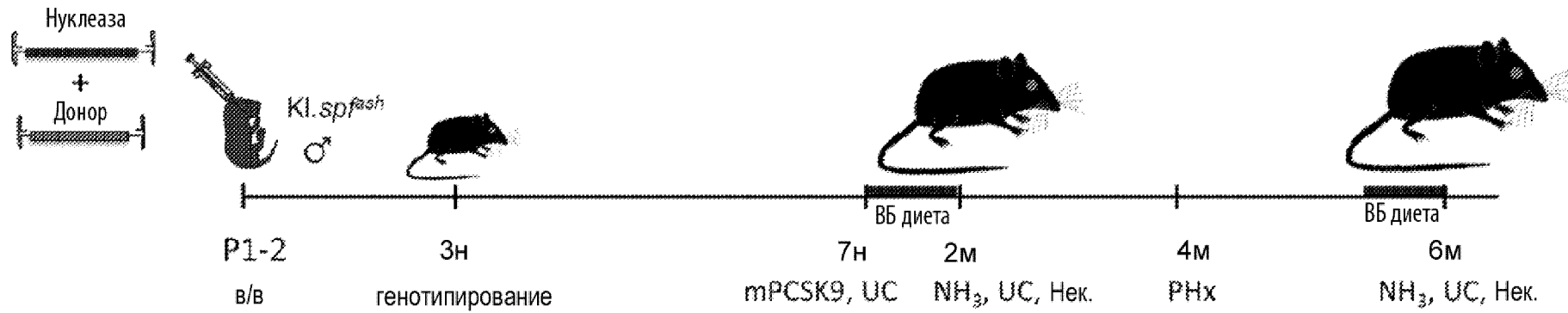


Фиг. 13

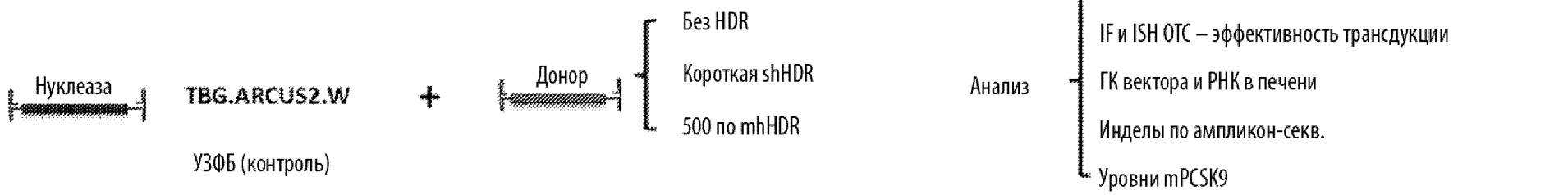


* 3 несовпадения в каждом плече

Фиг. 14А



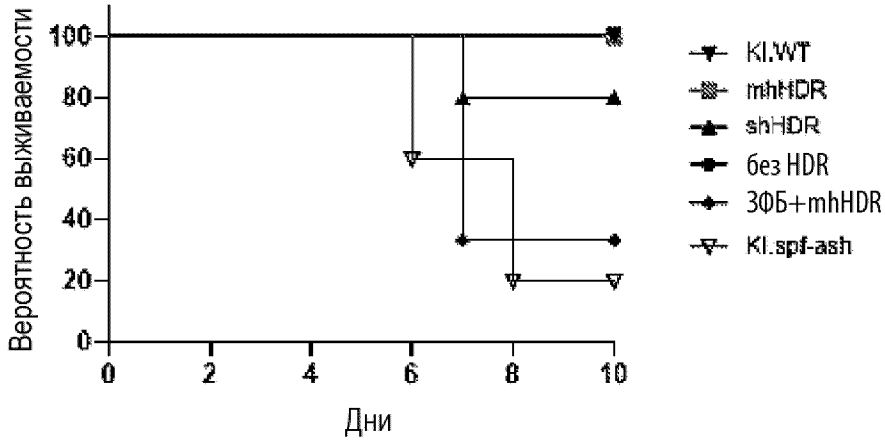
33/43



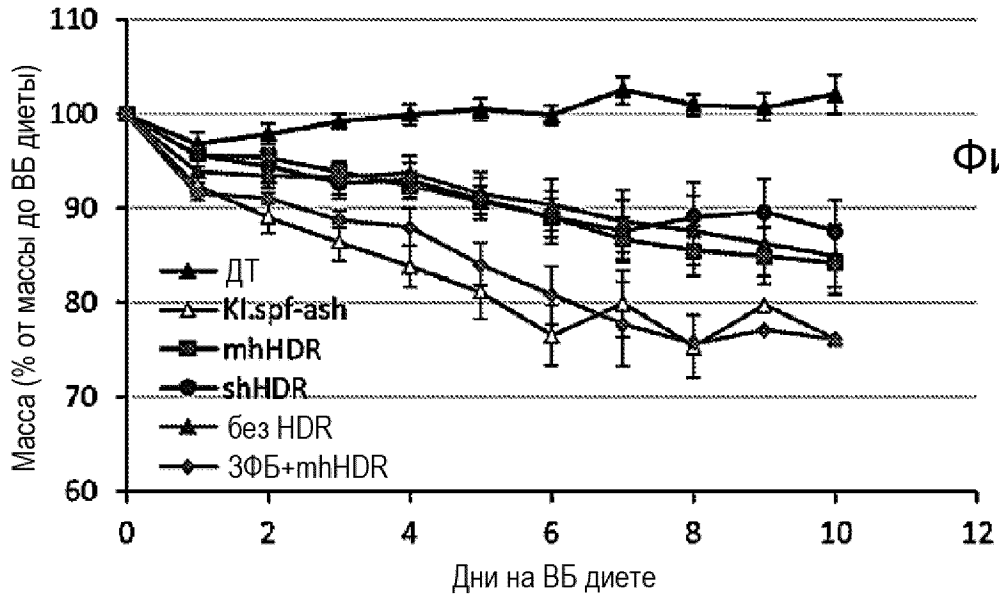
Фиг. 14В

| Группа | N | Экспрессирующий мегануклеазу M2PCSK9 вектор AAV (нацеленный на ген PCSK9) | Доза (ГК/кг) | Донорный вектор AAV | Доза (ГК/кг) |
|--------|----|---|----------------------|------------------------------|----------------------|
| 1 | 20 | AAVrh79.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bGH | $1,0 \times 10^{13}$ | AAVrh79.mhHDR.TBG.hOTCco.bGH | $3,0 \times 10^{13}$ |
| 2 | 20 | AAVrh79.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bGH | $1,0 \times 10^{13}$ | AAVrh79.shHDR.TBG.hOTCco.bGH | $3,0 \times 10^{13}$ |
| 3 | 20 | AAVrh79.TBG.PI.M2PCSK9.WPRE.bGH | $1,0 \times 10^{13}$ | AAVrh79.TBG.hOTCco.bGH | $3,0 \times 10^{13}$ |
| 4 | 20 | AAVrh79.TBG.PI.EGFP.WPRE.bGH (отрицательный контроль) | $1,0 \times 10^{13}$ | AAVrh79.mhHDR.TBG.hOTCco.bGH | $3,0 \times 10^{13}$ |
| 5 | 20 | НД | НД | НД | НД |

Выживаемость (10д ВБ)

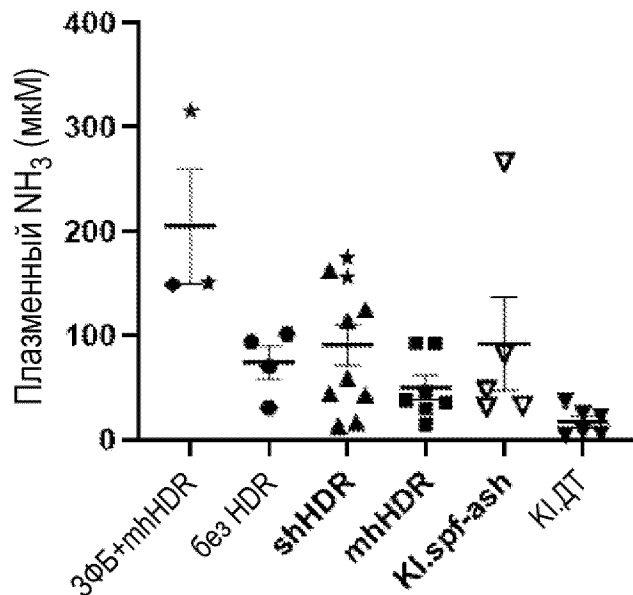


Фиг. 14С



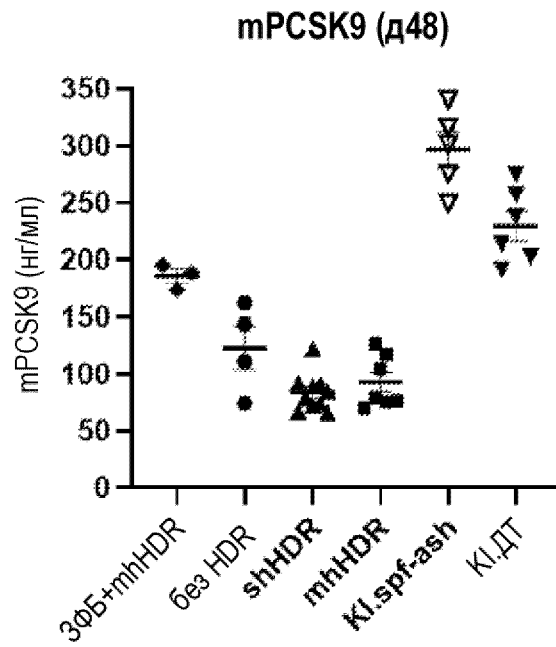
Фиг. 14D

Плазменный NH₃ (д10 – ВБ)

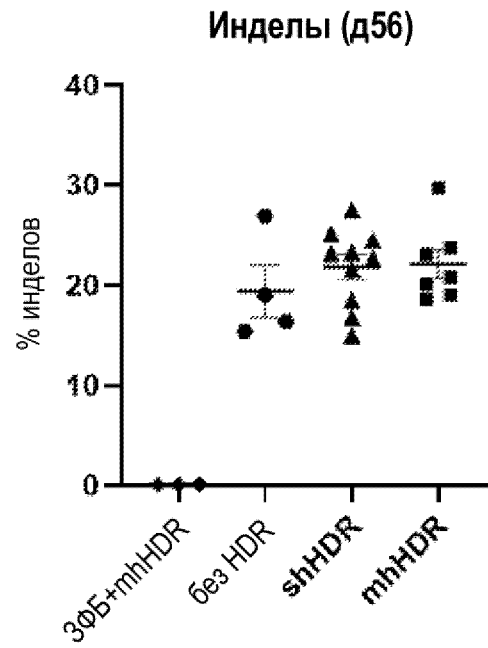


Фиг. 14Е

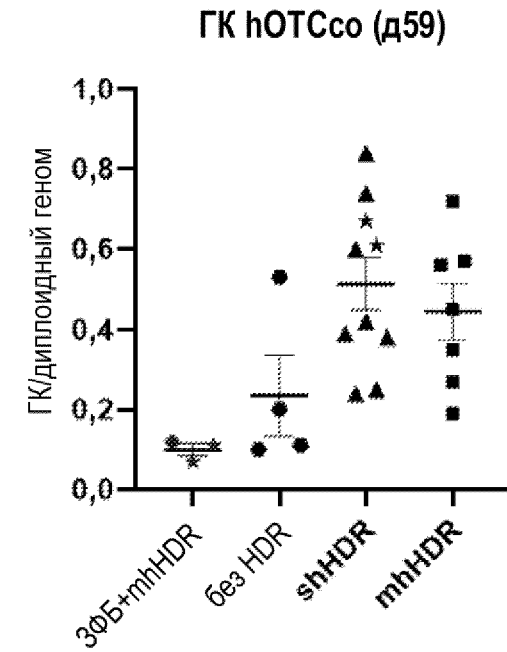
Фиг. 14F



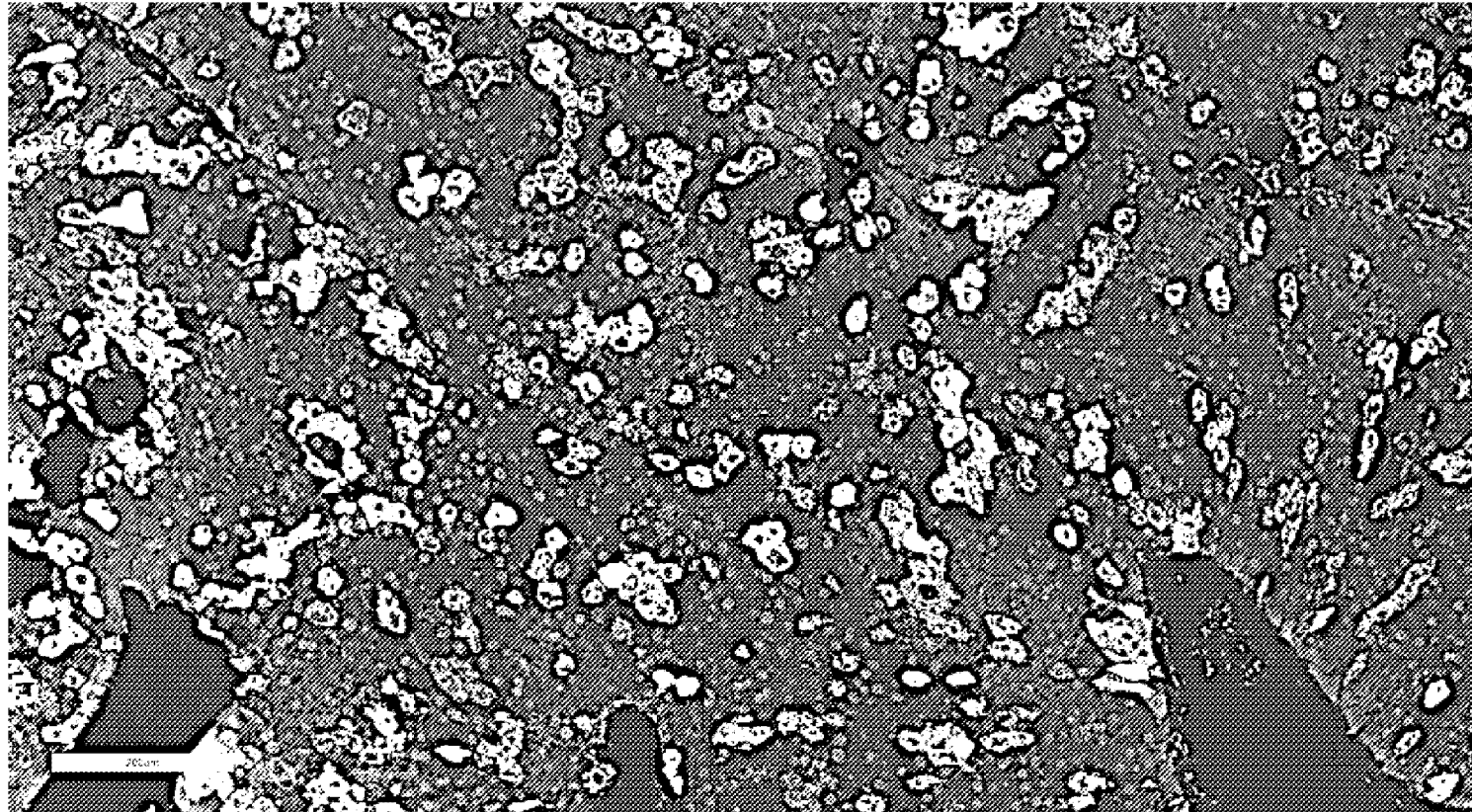
Фиг. 14G



Фиг. 14H

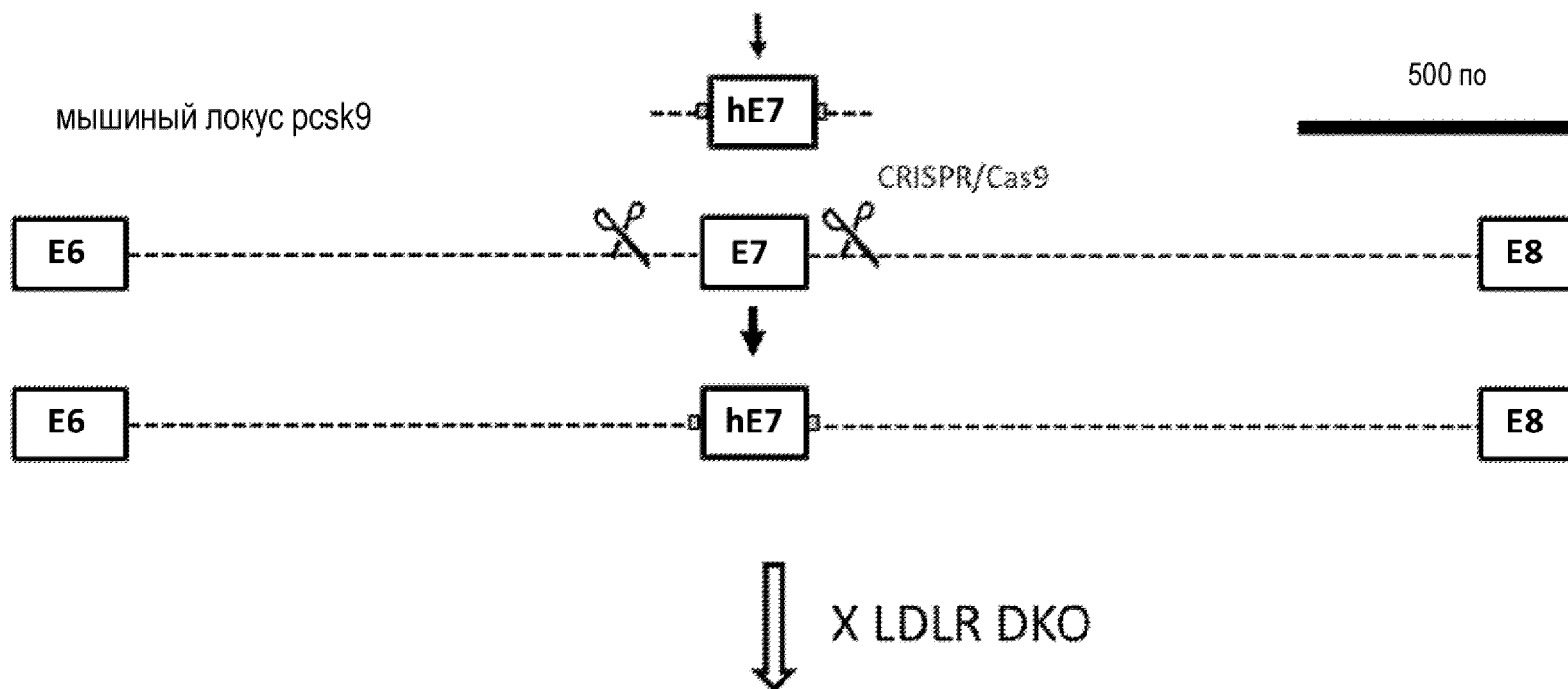


Фиг. 14I



Фиг. 15

Донор: 265 по последовательность PCSK9 человека [40 по + 184 по (hE7) + 41 по],
фланкируемая плечами HDR интронной послед. мыши

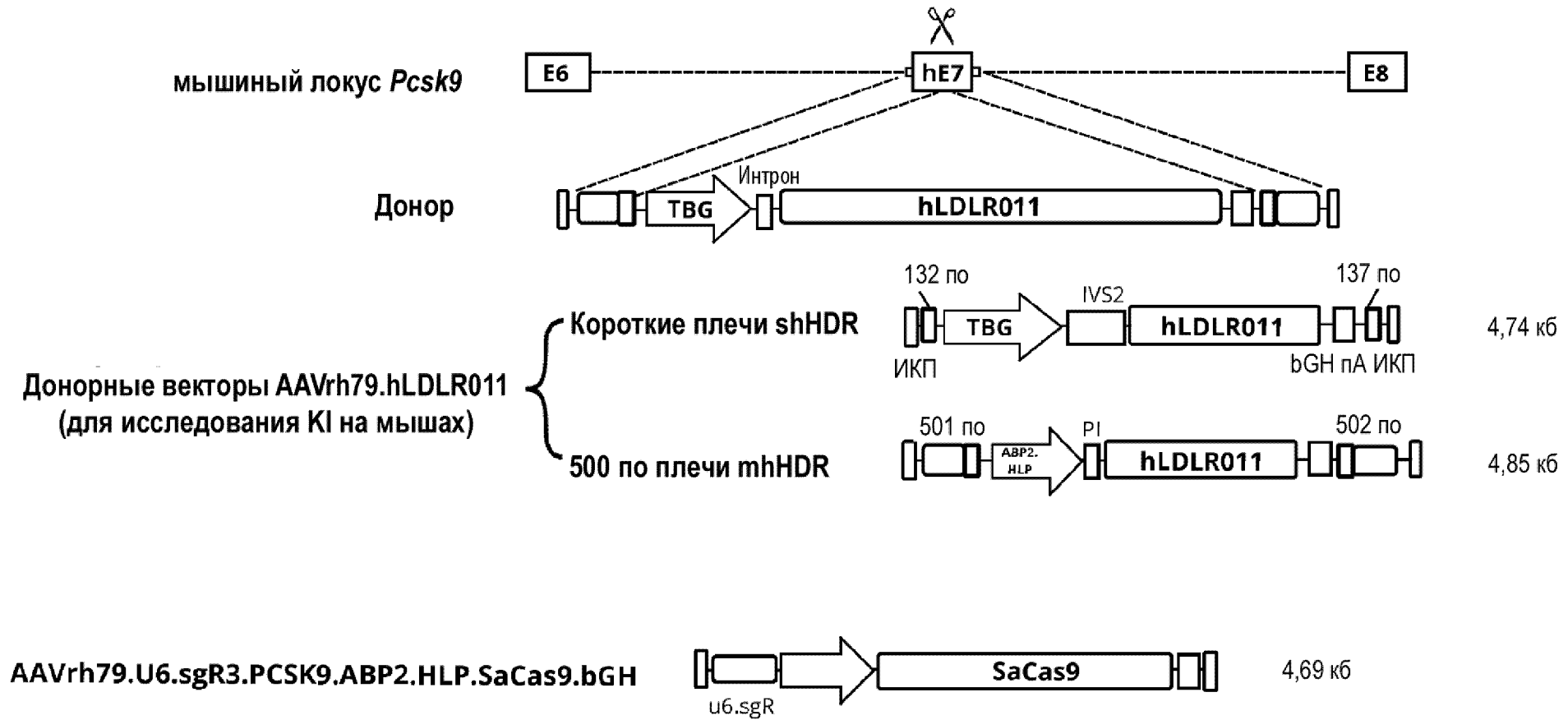


38/43

Мышиная модель *DKO PCSK9-hE7-KI.LDLR*

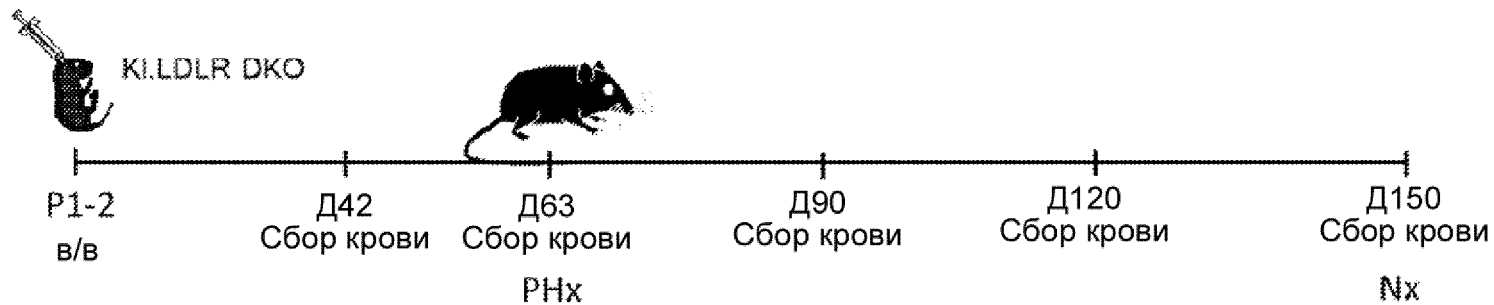
$hE7^{KI}/hE7^{KI}.Idlr^{-}/Idlr^{-}.apobec1^{-}/apobec1^{-}$ (модель заболевания *hoFH*)

Фиг. 16



Фиг. 17

W3448 – Дизайн исследования



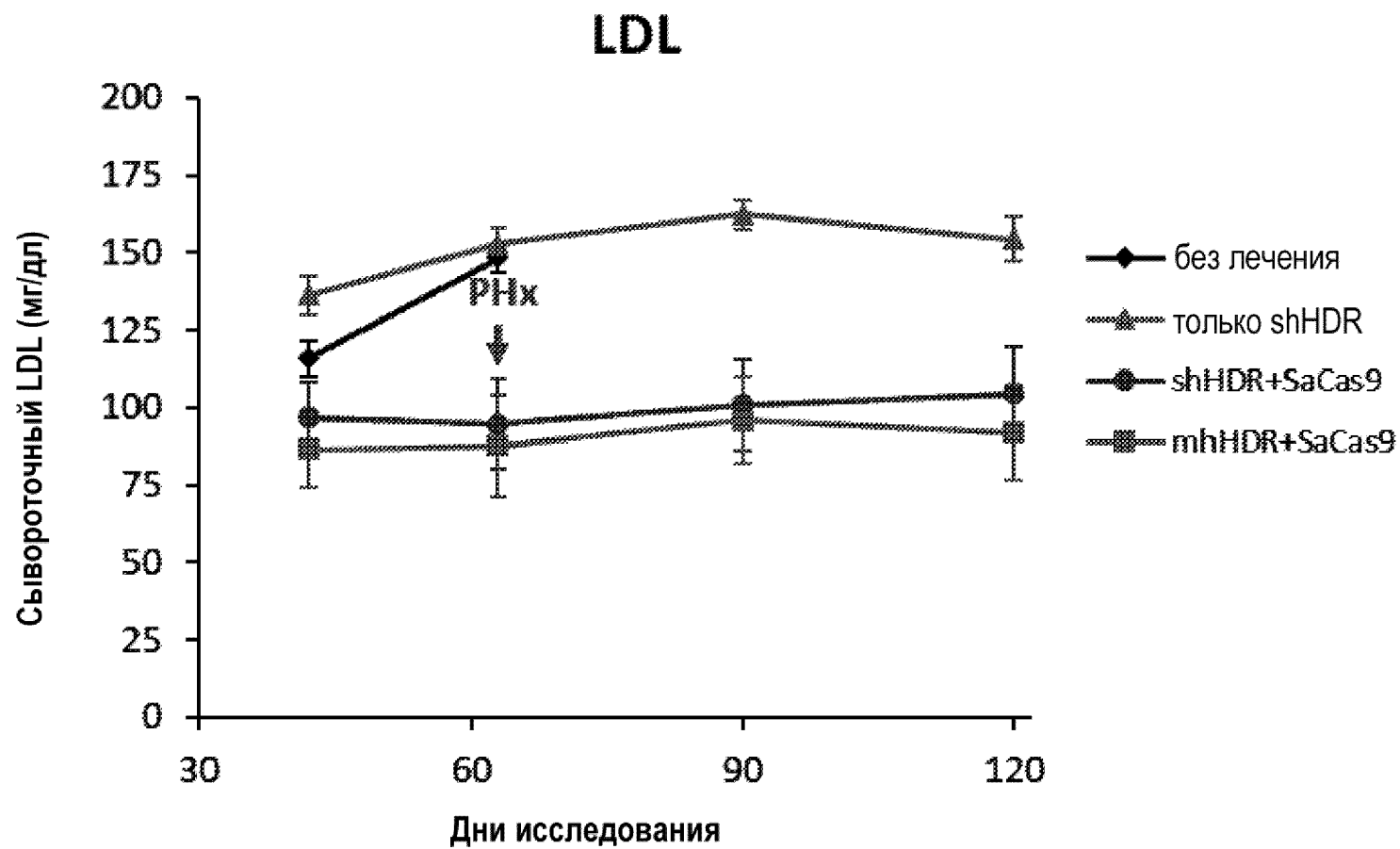
40/43

| Группа | Донорный вектор (3×10 ¹³ ГК/кг) | Нуклеаза (U6.sgR.hLP.SaCas9) (1×10 ¹³ ГК/кг) | Соотношение донор/нуклеаза |
|--------|--|---|----------------------------|
| 1 | mhHDR.hLDLR011 | SaCas9 | 3:1 |
| 2 | shHDR.hLDLR011 | SaCas9 | 3:1 |
| 3 | shHDR.hLDLR011 | ФСБ | НД |
| 4 | НД | НД | НД |

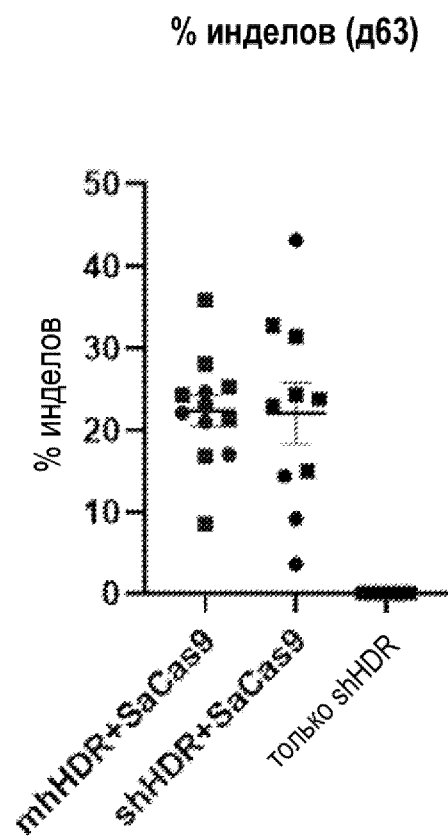
Анализ {

- LDL-с в сыворотке
- ИГХ и ISH LDLR – эффективность трансдукции
- ГК вектора и РНх в печени
- Ампликон-секв. уровни mPCSK9

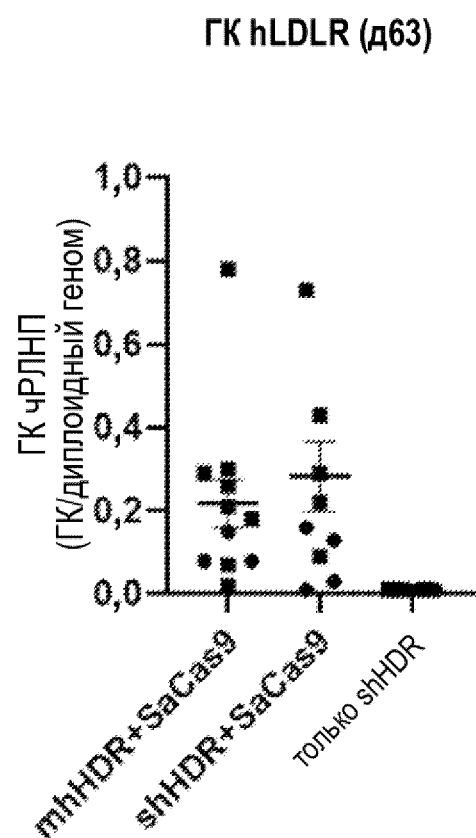
Фиг. 18А



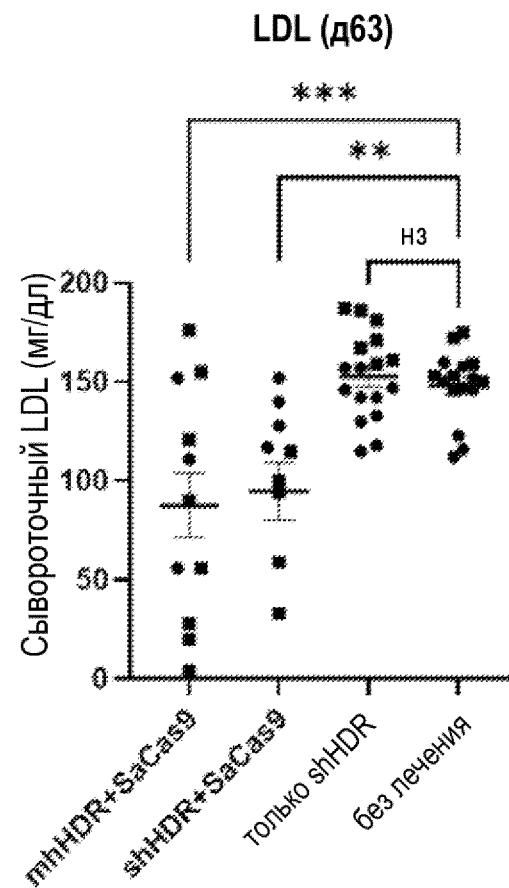
Фиг. 18B



Фиг. 18C

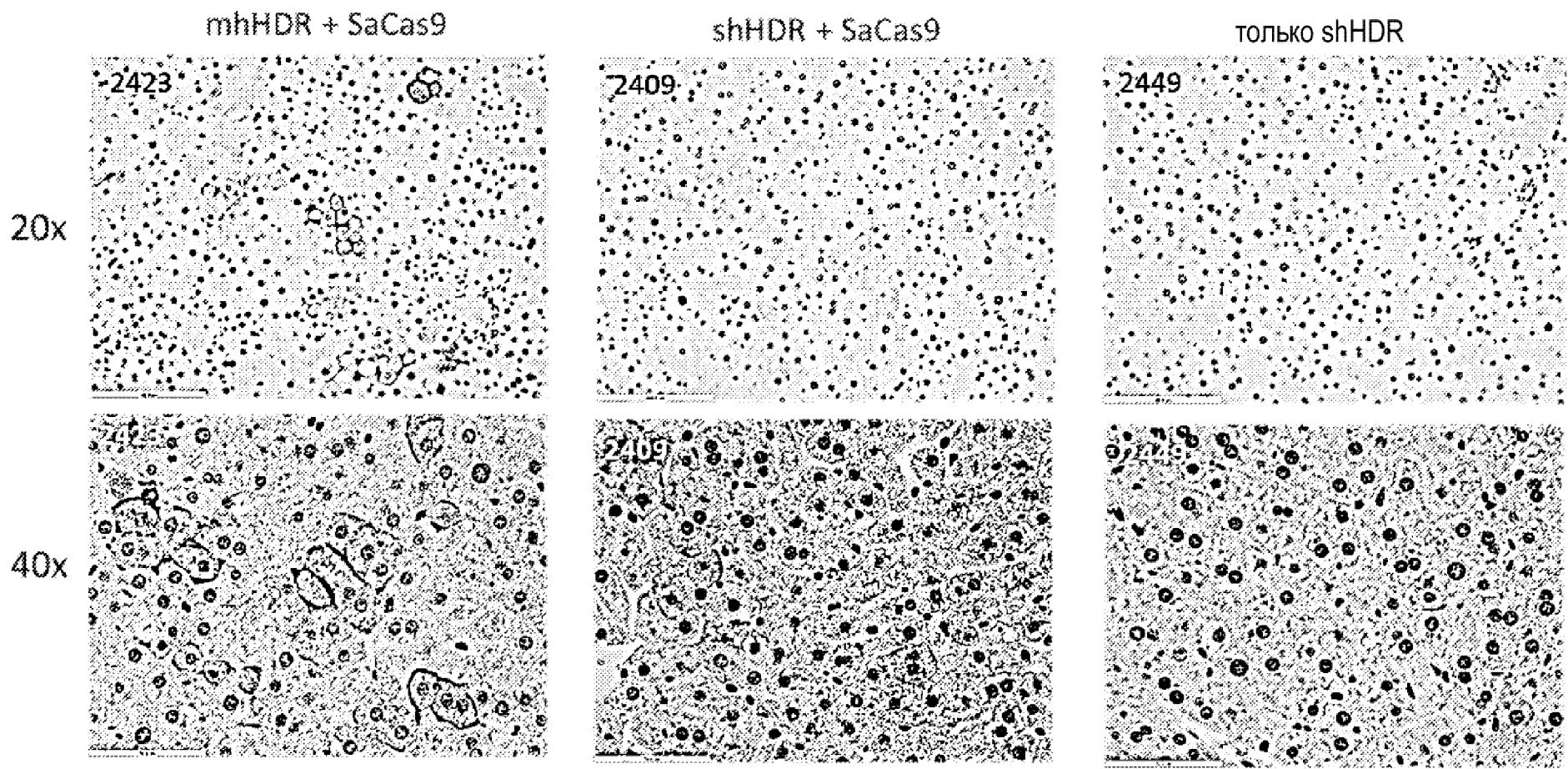


Фиг. 18D



Фиг. 19

День 63, печень после частичной гепатэктомии



43/43

Вскрытие животных будут проводить в день 150. Трансдукцию будут сравнивать до и после РНх в д63